COVID-19: una aproximación pluridisciplinar

Agustín García Asuero FRSC
(coordinador)

COVID-19:
una aproximación pluridisciplinar

Editorial Universidad de Sevilla

Sevilla 2026

Colección: Ciencias de la Salud
Núm.: 99

Comité editorial de
la Editorial Universidad de Sevilla:
Elena Leal Abad
(Directora de la Editorial Universidad de Sevilla)
Concepción Barrero Rodríguez
Rafael Fernández Chacón
María del Pópulo Pablo-Romero Gil-Delgado
Manuel Padilla Cruz
Marta Palenque
María Eugenia Petit-Breuilh Sepúlveda
Marina Ramos Serrano
José-Leonardo Ruiz Sánchez
Antonio Tejedor Cabrera

Reservados todos los derechos. Ni la totalidad ni parte de este libro puede reproducirse o transmitirse por ningún procedimiento electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia, grabación magnética o cualquier almacenamiento de información y sistema de recuperación, sin permiso escrito de la Editorial Universidad de Sevilla.

Motivo de cubierta: Visualización del SARS-Cov-2 con el microscopio electrónico de transmisión (ETM), https://wwwn.cdc.gov/phil/Details.aspx?pid=23354

© Editorial Universidad de Sevilla 2026
c/ Porvenir, 27 - 41013 Sevilla.
Tfnos.: 954 487 447; 954 487 451
Correo electrónico: info-eus@us.es
Web: https://editorial.us.es

© Agustín García Asuero FRSC (coordinador) 2026

© De los textos, los autores 2026

Impreso en papel ecológico
Impreso en España-Printed in Spain

ISBN 978-84-472-2687-0
Depósito Legal: SE 1561-2026

Maquetación y diseño de cubierta: Dosgraphic s.l. (dosgraphic@dosgraphic.es)
Impresión:

Índice

Agradecimientos 25

Prólogo 27
Mariano Esteban

Presentación 29
Agustín García Asuero FRSC

Capítulo I. Los suspiros y lamentos de Hades: en torno a la historia de las epidemias 31
Antonio González Bueno

Introducción 31
1. Una cuestión divina 32
2. Entre la realidad física del contacto y la consistencia etérea del aire 32
3. Los miasmas y los corpúsculos 33
4. Inoculación e inmunización 34
5. Cuestión de higiene 34
6. Microbiología y bacteriología 35
7. Vacunas y sueros 37
8. Corolario 38
Bibliografía 38

Capítulo II. COVID-19: aspectos diagnósticos, clínicos y terapéuticos 41
José López Barba, Elena Salamanca Rivera, Álvaro Pascual Hernández y Jesús Rodríguez Baño

1. Aspectos diagnósticos 41
   1.1. Introducción 41
   1.2. El virus SARS-CoV-2 41
   1.3. Técnicas diagnósticas microbiológicas 42
   1.4. Técnicas para el estudio de variantes SARS-CoV-2 48
2. Aspectos clínicos 49
   2.1. Generalidades 49

2.2. Fisiopatogenia 50
2.3. Características demográficas 50
2.4. Presentación respiratoria 50
2.5. Presentación digestiva 51
2.6. Presentación bifásica 51
2.7. Evaluación del riesgo de desarrollar un cuadro grave 51
3. Aspectos terapéuticos 51
3.1. Fármacos usados con cierta frecuencia en la primera ola, actualmente desaconsejados por haberse demostrado su falta de eficacia 52
3.2. Fármacos con actividad antiviral. 52
3.3. Fármacos con actividad antiinflamatoria o inmunomoduladora 54
3.4. Plasma hiperinmune 55
3.5. Otros 55
Bibliografía 55

Capítulo III. Pandemia COVID-19: análisis clínicos, laboratorios clínicos, medicina de laboratorio 59
Carlos Gómez Canga-Arguelles
Conclusiones 62
Bibliografía 62

Capítulo IV. Claves de la pandemia y primeras lecciones aprendidas 63
M. de los Ángeles Calvo Torrás
Conclusiones 69
Bibliografía 69

Capítulo V. Veterinaria y COVID-19 71
M. de los Ángeles Calvo Torras
Introducción 71
1. SARS-CoV-2: la pandemia desde la veterinaria 72
2. SARS-CoV (síndrome respiratorio agudo grave, SARS) 72
3. MERS (síndrome respiratorio grave de Oriente Medio) 72
4. SARS-CoV-2 (nuevo coronavirus identificado en Wuhan, China) 73
5. Los animales, agentes reservorios y de transmisión 73
5.1. Posible transmisión del virus SARS-CoV-2 del hombre a los animales de compañía 73
6. Recomendaciones de limpieza frente al coronavirus al sacar a pasear a mascotas 75
7. Alimentos y SARS-CoV-2 75
8. La vacuna HIPRA COVID-19 y sus características 76
8.1. Mecanismo de acción 76
Bibliografía 77

Capítulo VI. Precisión terminológica y creación léxica. A propósito de la pandemia coronavírica 81
Yolanda Congosto Martín
Introducción 81
1. Lenguaje especializado y lenguaje común 81
2. Préstamos, calcos y falsos amigos 83
3. Procedimientos de creación neológica 84
3.1. Neologismos formales 84
3.2. Préstamos léxicos 86
3.3. Neologismos semánticos 87
3.4. Otras voces y demás creaciones jocosas o palabros 88
4. Precisión léxico-semántica y difusión terminológica 91
5. Coronavirus Disease 2019. Sobre siglas y acrónimos 92
5.1. Cuestiones de ortografía 92
5.2. Cuestiones de morfología gramatical: el artículo 93
Conclusión 94
Bibliografía 94

Capítulo VII. La evolución de la infección COVID-19 en España 97
José Luis de Justo Alpañés
Introducción 97
1. Evolución de la pandemia en España 97
2. Estudio crítico de los datos proporcionados por el Gobierno español y las autonomías 98
2.1. Contagiados oficiales 98
3. Las pruebas de seroprevalencia 99
4. Un método para hallar los contagiados reales basándonos en los resultados de las pruebas de seroprevalencia 100
5. Número real de fallecidos 102
6. Activos 104
7. Comparación de curados y fallecidos 105
8. La letalidad del SARS-CoV-2 105
9. La gripalización de la COVID-19 107
10. El origen del SARS-CoV-2 107
Conclusiones 108
Bibliografía 109

Capítulo VIII. Modelos matemáticos de epidemias víricas: el caso de la COVID-19 111
Antonio Gómez Expósito, José A. Rosendo Macías y Miguel A. González Cagigal
Introducción y motivación 111
1. Conceptos preliminares: curvas y pendientes 112

2. Modelos estadísticos: filtrado y ajuste a curvas características ... 116
3. Modelos físicos: SIR y sus variantes ... 119
4. Modelos híbridos: filtro de Kalman ... 120
5. La pandemia de la COVID-19 ... 122
5.1. La primera ola y el efecto del confinamiento ... 123
5.2. Segunda ola y sucesivas ... 125
6. Efectos de la vacunación ... 127
Conclusiones ... 129
Bibliografía ... 130

Capítulo IX. COVID-19, seguridad alimentaria y nutrición ... 131
Ana Canals Caballero y Ana M. Troncoso González
Introducción ... 131
1. Evaluaciones de riesgos sobre la posible infección con SARS-CoV-2 a través de los alimentos ... 132
2. Origen zoonótico y otras especies susceptibles ... 133
3. Transmisión oral-fecal, aguas residuales y alimentos marinos ... 135
4. Presencia y supervivencia del virus en superficies y medio ambiente ... 135
5. Micronutrientes y compuestos bioactivos para el correcto funcionamiento del sistema inmune ... 136
5.1. Complementos alimenticios ... 138
5.2. Vitamina D ... 139
5.3. Zinc ... 142
5.4. Probióticos ... 142
6. Guías para una alimentación saludable en tiempos de COVID. Recomendaciones dietéticas ... 143
6.1. Obesidad y COVID ... 143
6.2. Cambios en los hábitos alimentarios y dietéticos durante el período de confinamiento ... 143
6.3. Alimentación saludable en tiempos de COVID-19 ... 144
Conclusiones ... 145
Abreviaturas ... 146
Bibliografía ... 146

Capítulo X. El impacto económico de la pandemia ... 153
Francisco Ferraro
1. La crisis económica en el mundo ... 153
1.1. Diferencias de la crisis con la Gran Recesión ... 155
2. El impacto en la economía española ... 157
3. Efectos y tendencias socioeconómicas provocadas por la pandemia ... 160
3.1. Aumento del papel del Estado ... 160
3.2. Inflación ... 161
3.3. Déficit y deuda pública ... 161

3.4. Globalización ... 162
3.5. Desigualdad y pobreza ... 162
3.6. Cambios en la producción y el consumo ... 163
Bibliografía ... 164

Capítulo XI. Turismo y COVID-19. Una mirada hacia adelante ... 165
Cristóbal Casanueva Rocha
Introducción ... 165
1. Economía vs. salud ... 167
2. La mano invisible vs. la mano visible ... 169
3. Individualismo vs. cooperación ... 171
4. Global vs. local ... 172
5. Inercia vs. cambio. El futuro está en juego ... 174
Conclusiones ... 175
Bibliografía ... 176

Capítulo XII. Aprendizajes desde la COVID-19 para la formación y el aprendizaje ... 179
Julio Cabero-Almenara
1. Para comenzar el análisis ... 179
2. Aprendizajes desde la pandemia ... 180
3. Aprendizajes que debemos adquirir ... 186
Bibliografía ... 189

Capítulo XIII. La alarma vs. legislación ordinaria contra pandemias en perspectiva comparada ... 193
Javier Barnés
Preámbulo ... 193
I. Introducción ... 194
I.1. El punto de partida en el ordenamiento español en la lucha contra el COVID-19. Estado de alarma y legislación sanitaria ... 194
I.2. Sentido y alcance de la alarma y de la legislación sanitaria. Una observación preliminar ... 194
I.2.1. Sobre la declaración de alarma ... 195
I.2.2. Sobre la legislación sanitaria en vigor ... 195
I.3. Una nota común a ambas opciones: la falta de reforma legislativa desde la irrupción de la pandemia y sus consecuencias. El problema de la ausencia de una ley general contra enfermedades infecciosas ... 196
I.4. Algunas precisiones previas sobre potestades ordinarias y extraordinarias del ejecutivo y de las administraciones en la lucha contra la pandemia ... 197

1.4.1. La diferenciación entre emergencia ordinaria y emergencia extraordinaria 197
1.4.2. La correspondiente delimitación entre potestades ordinarias y potestades extraordinarias 198
1.4.3. La distinción entre restricciones singulares y restricciones de carácter general, entre el control de enfermos y el control de personas sanas 198
1.4.4. La delimitación entre la actividad administrativa de policía sanitaria y los poderes de emergencia extraordinaria; entre la praxis de la legislación histórica de salud pública y las exigencias del Estado constitucional de derecho 199
1.4.5. La distinción entre las declaraciones formales de emergencia (extraordinaria) y su efectivo ejercicio fuera de tales declaraciones 199
1.4.6. Un resumen sobre la distinción entre el derecho ordinario y el extraordinario 199
2. La abdicación de la «función legislativa del estado» (art. 66.2 CE) 200
2.1. Las diversas opciones del legislador estatal 200
2.2. El problema constitucional de fondo 201
2.2.1. La resistencia de las Cortes a aprobar un derecho extraordinario de emergencia sanitaria 201
2.2.2. La externalización del coste político de la lucha contra la pandemia hacia las Comunidades Autónomas y los jueces 202
2.3. Problemas constitucionales derivados en períodos de «entre alarmas» y de «posalarma» 202
2.4. ¿Remedios jurídicos directos frente a la inactividad parlamentaria? La experiencia comparada 203
3. Una mirada comparada sobre el principio de legalidad en la lucha contra el COVID-19 203
3.1. Reino Unido 204
3.1.1. Introducción. La infraestructura legal previa a la pandemia del COVID-19: Ley de Salud Pública para el Control de Enfermedades (1984) y la Ley de Emergencias Civiles (2004) 204
3.1.2. La Ley del Coronavirus de 2020 207
3.1.3. Breve recapitulación 207
3.2. Alemania 208
3.2.1. Introducción. La infraestructura legal previa a la pandemia del COVID-19: la Ley Federal contra las enfermedades contagiosas 208
3.2.2. Potestades ordinarias y extraordinarias en la LEC 209
3.2.3. La Sentencia constitucional sobre el deber del legislador de proteger la vida y de evitar la discriminación de las personas discapacitadas en el triaje 210
3.3. Un balance sobre el principio de legalidad en la lucha contra la pandemia 211

4. La quiebra del principio de legalidad y de la reserva de ley en el ordenamiento español en la lucha contra el COVID-19 211
4.1. La ausencia de una ley de lucha contra las enfermedades contagiosas 211
4.1.1. Inexistencia de una ley de enfermedades infecciosas que se active y conecte con el estado de alarma 212
4.1.2. Manifiesta insuficiencia del derecho ordinario contra las enfermedades infecciosas 212
4.2. La jurisprudencia del tribunal supremo en «casación» sobre ratificación de medidas de carácter general 213
Una reflexión final. La crisis de la democracia parlamentaria 215

Capítulo XIV. Una historia de éxito. Experiencia de la lucha contra la COVID-19 desde la industria farmacéutica 219
Francisco Javier Fernández
1. ¿La carrera investigadora más grande de la historia de la medicina? 219
2. La colaboración público-privada: realidad y futuro 220
3. El desafío de la producción 221
4. El papel crítico de las patentes 222
5. España: un protagonismo esclarecedor 224
6. Una experiencia que debe ayudar para el futuro 226
Bibliografía 227

Capítulo XV. Biología del SARS-CoV-2 229
Alfonso Ruiz-Bravo López y María Jiménez Valera
Introducción 229
1. Situación taxonómica 230
2. Características del virus 231
2.1. Morfología 231
2.2. Proteínas estructurales 232
2.2.1. Proteína S 232
2.2.2. Proteína M 232
2.2.3. Proteína E 232
2.2.4. Proteína N 233
2.3. Genoma 234
2.4. Proteínas no estructurales y proteínas accesorias 235
2.4.1. Proteínas no estructurales 235
2.4.2. Proteínas accesorias 239
3. Infección celular 242
3.1. Receptores del virus en la superficie celular 242
3.1.1. Expresión de ACE2 242
3.1.2. Correceptores 242
3.1.3. ¿Otros receptores? 243

3.2. Unión al receptor, fusión con la membrana citoplásmica y entrada en la célula 243
3.2.1. Unión al receptor 243
3.2.2. Fusión con la membrana y entrada en la célula 244
3.3. Síntesis y procesamiento de las poliproteínas 247
3.4. Replicación y transcripción 248
3.5. Ensamblaje y liberación de la progenie viral 251
4. Implicaciones de la biología del SARS-CoV-2 en la patogénesis 252
Bibliografía 253

Capítulo XVI. Biosensores electroquímicos en el diagnóstico y pronóstico del SARS-CoV-2 259
Beatriz Jurado Sánchez y Fidel Ortega Ortiz de Apodaca
1. Biosensores 259
2. Biosensores electroquímicos: definición y tipos 260
3. Biosensores y SARS-CoV-2 261
3.1. (Bio)sensores directos 261
3.2. Genosensores 263
3.3. Inmunosensores 264
3.4. Otros biosensores electroquímicos para la detección de biomarcadores útiles en el pronóstico de la COVID-19 267
Conclusiones 269
Bibliografía 269

Capítulo XVII. Algunos avances recientes y tendencias emergentes en métodos analíticos para COVID-19 273
Julia Martín Bueno, Noelia Tena Pajuelo y Agustín García Asuero
Introducción 273
1. Aislamiento y detección del SARS-CoV-2 275
2. Genoma del SARS-CoV-2 276
3. Métodos de detección del SARS-CoV-2 277
4. Detección de proteínas virales del SARS-CoV-2: espectrometría de masas 278
5. Importancia de la nanotecnología 281
6. Reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR) 282
7. Lab-on-a-chip (LOC) 284
8. Importancia de las técnicas emergentes 285
9. Aptámeros 285
10. Polímeros de impronta molecular 287
11. Microarrays 288
12. Ensayos de aglutinación 288
13. Dispositivos basados en papel 289
14. Reconocimiento de dianas simultáneas (ensayos multiplexores) 290
15. Biomarcadores 291

16. Dispositivos de puntos de atención (POC) 293
17. Robots 294
18. Secuenciación de próxima generación (secuenciación metagenómica de próxima generación [mNGS]) 296
19. Uso de pseudovirus 297
20. IoT/IoMT: medicina de precisión 298
21. Biosensores 300
22. Marcos orgánicos metálicos (*metal-organic frameworks*) 302
23. Tomografía computarizada 303
24. Pruebas de anticuerpos 304
25. Sensores corporales y teléfonos celulares 306
26. CRISP 307
27. Esfuerzos multidisciplinares 308
Comentarios finales 309
Bibliografía 311

Capítulo XVIII. Aspectos bioquímicos relacionados con la patogenicidad del coronavirus SARS-CoV-2 333
Cristina Garzón-Rodriguez, Antonio Ayala, Ana Gómez y Mario F. Muñoz
Introducción 333
1. Aspectos estructurales del coronavirus SARS-CoV-2 333
2. Ingreso de SARS-CoV-2 en la célula huésped. Interacción con los receptores y proteasas celulares de la célula huésped 336
3. Mecanismo de replicación, transcripción y traducción del SARS-CoV-2 339
4. Afectación de la coagulación y el sistema vascular por SARS-CoV-2 340
5. Estrés oxidativo y muerte celular producido por SARS-CoV-2 342
6. Ferritina plasmática en pacientes con COVID-19 343
7. Aparición de nuevas variantes 344
Bibliografía 344

Capítulo XIX. Desarrollo de agentes antivirales: coronavirus y la COVID-19. Estado de la situación 347
José Manuel Vega Pérez
Introducción 347
1. El virus 348
2. Antivirales de molécula pequeña. La polimerasa RdRp como diana 351
3. Antivirales de molécula pequeña. El caso de la *proteasa principal* del coronavirus 353
3.1. Inhibidores covalentes irreversibles. Grupo electrofílico: carbonilo α,β-insaturado 356
3.2. Inhibidores reversibles. Grupo electrofílico: α-cetoamida 357
3.3. Grupo electrofílico: aldehído 359

3.4. Modulando el carácter reversible/irreversible de la inhibición. Grupo electrofílico: α-aciloxi/α-hidroxicetonas 360
3.5. Primer inhibidor de la proteasa principal del SARS-CoV-2 de administración oral 362
3.6. Búsqueda de inhibidores de la proteasa mpro de SARS-CoV-2 a través de la estrategia de reutilización (*repurposing*) o reposicionamiento (*repositioning*) 363
Bibliografía 364

Capítulo XX. El COVID-19 en el medio ambiente: presencia, persistencia, transmisión, vigilancia, inactivación y desafíos 369
José Luis Gómez Ariza
Introducción 369
1. Virus y pandemia 371
2. Los virus intestinales. Una gran amenaza para el medio ambiente 371
3. Presencia del SARS-CoV-2 en aguas, aguas residuales y lodos de depuradoras 372
3.1. Aguas residuales 373
3.2. Aguas 373
3.3. Plantas de tratamiento de aguas residuales 373
4. Presencia del SARS-CoV-2 en el aire 375
5. Persistencia del virus 376
6. Rutas de exposición medioambiental para la transmisión del virus 379
6.1. Transmisión por la atmósfera – aerosoles cargados de virus 379
7. Factores medioambientales que influyen en la transmisión del virus 380
7.1. Temperatura 380
7.2. Humedad y lluvia 380
7.3. Bivalvos 381
8. Análisis del COVID-19 en fuentes acuáticas y aguas residuales 381
8.1. Toma y preservación de la muestra 381
8.2. Preparación de la muestra para la determinación del virus 381
8.3. Detección del virus 384
8.4. Control de calidad de los análisis 384
9. Inactivación del virus 385
9.1. Plantas de tratamiento de aguas residuales 385
9.2. Procesos y tecnologías de desinfección 385
9.2.1. Procesos convencionales de desinfección 385
9.2.2. Procesos emergentes de desinfección 386
9.3. Mecanismos de inactivación de los virus 386
9.3.1. Mecanismos de inactivación de los virus con envoltura 387
10. Estudios epidemiológicos – vigilancia de alerta temprana de detección y difusión 387
Retos y recomendaciones 388
Bibliografía 389

Capítulo XXI. Importancia de la patología oral en el desarrollo de la infección por SARS-CoV-2: criterios de causalidad y asociación 401
Guillermo Machuca Portillo y Clara Bueno Guerrero
Introducción 401
1. El estudio de las repercusiones de las enfermedades orales en la salud general en la actualidad 402
2. Papel de la orofaringe en la transmisión del SARS-CoV-2 403
3. Papel de los receptores para angiotensina II (ACE2) de la orofaringe en la transmisión del SARS-CoV-2 404
4. La cavidad oral como puerta de entrada del SARS-CoV-2 404
5. Criterios de causalidad y asociación de la lesiones orales producidas por el SARS-CoV-2 405
5.1. Trastornos del gusto 405
5.2. Xerostomía 407
5.3. Halitosis 407
5.4. Parotiditis y sialoadenitis 407
5.5. Lesiones en la mucosa oral 407
5.6. Salud periodontal e infección por el virus SARS-CoV-2 410
5.7. Conclusiones acerca de la relación entre el SARS-CoV-2 y las lesiones de la cavidad oral 411
6. Eficacia de los colutorios en la reducción de la contaminación orofaríngea por el SARS-CoV-2 411
Bibliografía 413

Capítulo XXII. Tratamiento farmacológico del COVID-19: estado actual y estrategias futuras para el tratamiento de la enfermedad 417
Sofía Miñano Meneres, Ángel Vilches Arenas y Francisco Javier Miñano Sánchez
Introducción 417
1. Epidemiología 418
2. Evolución clínica de la infección por SARS-CoV-2 420
3. SARS-CoV-2: virología y dianas farmacológicas 420
4. Estrategias farmacológicas frente al SARS-CoV-2 420
5. Terapias farmacológicas para el COVID-19 422
5.1. Fármacos antivirales 422
5.1.1. Inhibidores de la polimerasa 422
5.1.2. Inhibidores de la proteasa 425
5.1.3. Anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-SARS-CoV-2 426
5.2. Fármacos inmunomoduladores 431
5.3. Plasma de convalecencia 433
5.4. Otros tratamientos 433
5.4.1. Inhibidores de la Janus quinasa (JAK) 433
5.4.2. Inhibidores de la tirosina quinasa 434
5.5. Otros fármacos estudiados para su uso en pacientes con COVID-19 de dudosa eficacia 435

6. COVID-19: ensayos clínicos en curso 436
7. Era omicrónica. Estado actual de los tratamientos contra el COVID-19 436
7.1. Tratamientos contra el COVID-19 en el caso de las personas que no presentan un cuadro grave de COVID-19 437
8. Situación actual de los medicamentos para pacientes con COVID-19 en España 437
8.1. Ronapreve® (Casirivimab/imdevimab) 438
8.2. Xevudy® (Sotrovimab) 438
8.3. Veklury® (Remdesivir) 438
8.4. Lagevrio® (Molnupiravir) 438
9. Consideraciones sobre el uso de medicamentos concomitantes en pacientes con COVID-19 438
10. Orientaciones futuras 439
Conclusiones 439
Bibliografía 439

Capítulo XXIII. Nanotecnologías para el diagnóstico precoz: el caso de la COVID-19 447

Francisco Gámiz, Carlos Sampedro, Carlos Márquez, Jorge Ávila, Carlos Navarro, María Isabel Recio, José Carlos Galdón y María Elena Marcos

Introducción 447
1. Biosensores basados en nanomateriales 449
1.1. Biorreceptores para biosensores basados en materiales bidimensionales 450
1.1.1. Biorreceptores basados en el sistema antígeno-anticuerpo ... 451
1.1.2. Biorreceptores basados en ácidos nucleicos 452
1.1.3. Biorreceptores basados en enzimas catalíticas 452
1.2. Nanomateriales bidimensionales como transductores 452
1.2.1. El grafeno y sus propiedades 452
1.2.2. Técnicas de síntesis de grafeno 454
1.3. Inmovilización de biomoléculas sobre la superficie del grafeno 458
1.4. Mecanismos sensores 458
1.4.1. Nanobiosensores basados en métodos de detección óptica 458
1.4.2. Nanobiosensores basados en métodos electroquímicos 460
1.4.3. Nanobiosensores basados en transistores de efecto campo 462
2. Biosensores basados en grafeno 466
2.1. El transistor de efecto campo de grafeno 466
2.2. El biosensor FET de grafeno 468
3. Detección de SARS-CoV-2 mediante biosensores basados en transistores de grafeno 471
3.1. Plataforma sensora UGRVID 471
Agradecimientos 473
Bibliografía 473

Capítulo XXIV. Nanopartículas en la prevención, tratamiento y diagnóstico de la COVID-19 481
M.ª Adolfina Ruiz, Elena Ortega y M.ª Encarnación Morales
Introducción 481
1. Nanotecnología 482
1.1. Nanomateriales poliméricos 484
1.2. Nanomateriales no poliméricos 484
1.3. Nanomateriales lipídicos 485
2. Vacunas 486
3. Tratamiento 488
4. Diagnóstico 490
4.1. Test rápidos 490
4.2. PCR 491
5. Otras aplicaciones de las nanopartículas en la época COVID 492
5.1. Equipo de protección individual (EPI) 492
5.2. Superficies 494
6. Proyectos futuros 495
Conclusiones 495
Bibliografía 495

Capítulo XXV. Vacunas basadas en partículas similares a virus y su papel en la pandemia de la COVID-19 501
Patrícia Piçarra y Olga Borges
Introducción 501
1. El virus y su estructura 502
2. Métodos de producción de VLPS – sistema de expresión 506
2.1. Bacterias: una oportunidad de investigación 506
2.2. Levadura: el sistema de expresión más probado 508
2.3. Baculovirus/Células de insectos: uno de los más utilizados 508
2.4. Plantas: ¿el objetivo son las vacunas comestibles? 509
2.5. Células de mamíferos: la producción de las VLP más complejas 509
3. Vacunas candidatas VLP SARS-CoV-2 510
3.1. Las plantas como sistema de producción y la tecnología Proficia® 510
3.2. Vacuna basada en células de mamíferos 511
3.3. Tecnología SpyTag/SpyCatcher 511
3.4. Otros 512
Conclusión y perspectivas futuras 512
Agradecimientos 513
Bibliografía 513

Capítulo XXVI. Vacunas frente a la COVID-19 519

María Jiménez Valera y Alfonso Ruiz-Bravo López

Introducción 519
¿Por qué era urgente disponer de vacunas frente a la COVID-19? 519
El desarrollo de una nueva vacuna era un proceso lento 520
Las vacunas frente a la COVID-19 han estado disponibles en un tiempo asombrosamente corto 521
Lo que nos enseñaron los brotes del SARS y del MERS 521

1. ¿Cómo se hacen las vacunas? 523
1.1. Inmunidad frente a infecciones 523
1.1.1. Inmunidad innata 523
1.1.2. Inmunidad específica 523
1.2. ¿Qué es una vacuna? 528
1.2.1. Antígenos protectores 529
1.3. Evolución de las vacunas 529
1.3.1. De las primeras vacunas a las actuales 529
1.3.2. Adyuvantes 530
1.3.3. Perspectivas de las vacunas 531
1.4. Tipos de vacunas 532
1.4.1. Vacunas de patógenos atenuados 532
1.4.2. Vacunas inactivadas 532
1.4.3. Toxoides 533
1.4.4. Vacunas subunidad 533
1.4.5. Vacunas vectorizadas por microorganismos 535
1.4.6. Vacunas DNA 538
1.4.7. Vacunas de mRNA 539

2. Inmunidad frente a la infección por SARS-CoV-2 542
2.1. Respuesta de anticuerpos 542
2.1.1. Técnicas de determinación de anticuerpos 542
2.1.2. Correlación entre respuesta de anticuerpos y gravedad de la infección 542
2.1.3. Duración de la respuesta de anticuerpos 543
2.2. Inmunidad celular 544

3. Vacunas frente a la COVID-19 544
3.1. Consideraciones generales 544
3.1.1. Antígenos protectores 545
3.1.2. Ensayos preclínicos: modelos de infección experimental 545
3.1.3. Plataformas 546
3.1.4. La autorización por EUL 546
3.2. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas de mRNA 546
3.2.1. Comirnaty (Pfizer/BioNTech) 546
3.2.2. Spikevax (Moderna) 548
3.3. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas de vector adenovirus 549
3.3.1. Vaxzevria (Oxford/AstraZeneca) y Covishield (Serum Institute of India) 549

3.3.2. Jcovden (Janssen Pharmaceutical Companies) 550
3.3.3. Convidecia (CanSino Biologics) 550
3.4. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas de proteínas recombinantes 551
3.4.1. Nuvaxovid (Novavax) 551
3.4.2. Covovax (Serum Institute of India) 552
3.4.3. SKYCovione (SK Bioscience) 552
3.5. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas con virus completo inactivado 552
3.5.1. CoronaVac (Sinovac Life Sciences Co., Ltd) 552
3.5.2. Sinopharm COVID-19 vaccine o BBIBP-CorV (Sinopharm CNBG y Beijing Institute of Biological Products) 553
3.5.3. Covaxin (Bharat Biotech) 553
3.6. Vacunas autorizadas por la Comisión Europea 554
3.6.1. VLA2001 554
3.6.2. VidPrevtyn Beta 555
3.6.3. BIMERVAX 555
3.7. Otras vacunas 555
3.7.1. Diversidad de vacunas candidatas frente a la COVID-19 555
3.7.2. Vacunas en estado de evaluación para su autorización por EUL 556
3.7.3. Vacunas de administración intranasal 559
3.7.4. Vacunas españolas 560
3.8. Regímenes de vacunación heterólogos 561
3.9. Vacunación frente a COVID-19 en situaciones especiales 563
3.9.1. Embarazo 563
3.9.2. Pacientes sometidos a terapias inmunosupresoras 564
3.9.3. Pacientes con cáncer 565
3.9.4. Otros grupos de riesgo 565
3.10. Efectos adversos graves asociados o atribuidos a vacunas frente a COVID-19 565
3.10.1. Trombosis con trombocitopenia 566
3.10.2. Miocarditis y pericarditis 568
3.10.3. Otros efectos adversos 569
3.10.4. El problema de la posible retrotrotranscripción del mRNA 570
3.11. Perspectivas de las vacunas frente a COVID-19 571
3.11.1. El panorama actual 571
3.11.2. Duración de la inmunidad 572
3.11.3. Distribución equitativa de las vacunas 573
3.11.4. Variantes del SARS-CoV-2 y escape de la inmunidad previa 573
3.11.5. Composición de las nuevas vacunas y vacuna pancoronavirus 576
3.11.6. Lecciones para el futuro 578
Bibliografía 579

Capítulo XXVII. Tratamiento antiviral de COVID-19. Un desafío desde el punto de vista del descubrimiento de fármacos 595

José Carlos Menéndez

Introducción 595

1. Tratamiento de COVID-19 y reposicionamiento de fármacos 596
2. Estructura del virus 596
3. El ciclo de multiplicación viral y las principales dianas terapéuticas potenciales asociadas 596
4. Fármacos que interaccionan con la proteína S 599
   - 4.1. El reconocimiento de ACE-2 por la proteína S como diana terapéutica 599
   - 4.2. Fármacos que interaccionan con la proteína S 600
5. Inhibidores de TMPRSS 600
6. Fármacos que dificultan la liberación del genoma vírico 603
   - 6.1. Cloroquina e hidroxicloroquina 603
   - 6.2. Unifenovir 604
7. Inhibidores de proteasas víricas 604
   - 7.1. La combinación lopinavir-ritonavir 604
   - 7.2. Lufotrelvir y nimatrelvir 606
8. Fármacos que impiden la replicación del genoma viral 606
   - 8.1. Introducción 606
   - 8.2. Remdesivir 608
   - 8.3. Bemnifosbuvir (AT-527) 610
   - 8.4. Favipiravir 611
   - 8.5. Otros inhibidores de ARN polimerasas 611
9. Molnupiravir 612
10. Antivirales que actúan en dianas del hospedador 613
    - 10.1. Plitidepsina 613
    - 10.2. Ivermectina 613

Conclusiones 614

Bibliografía 614

Capítulo XXVIII. La necesidad de descarte de tratamientos en el ámbito de la COVID-19 617

Daniel Echeverría-Esnal, Olivia Ferrández-Quirante, María Eugenia Navarrete-Rouco, Alicia Rodríguez-Alarcón, Nuria Carballo y Santiago Grau

Introducción 617

1. Antibióticos 617
   - 1.1. Antibióticos 617
   - 1.2. Azitromicina 618
2. Bamlanivimab / etesivimab 619
3. Casirivimab / imdevimab 620
4. Cloroquina / hidroxicloroquina 621

5. Colchicina 622
6. Corticosteroides inhalados 623
7. Favipiravir 624
8. Fluvoxamina 625
9. Interferón 625
10. Ivermectina 626
11. Lopinavir / ritonavir 627
12. Ozono 628
13. Vitamina D 629
14. Limitaciones 630
Conclusiones 630
Bibliografía 631

Capítulo XXIX. Respuesta a la pandemia en la Reglamentacion del medicamento. Excepciones para hacer frente a la pandemia que se pueden convertir en reglas 641
Emili Esteve Sala
Introducción 641
1. La investigación clínica 642
2. La fabricación y distribución de medicamentos 644
2.1. Medicamentos esenciales/estratégicos 646
2.2. Distribución de medicamentos ambulatorios de dispensación hospitalaria 648
3. La normativa de la UE 649
3.1. HERA. Autoridad Europea de Preparación y Respuestas Sanitarias 650
3.2. El refuerzo del papel de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) 652
3.3. La futura legislación europea sobre el medicamento. La Estrategia Farmacéutica Europea 655
Conclusiones 656
Bibliografía 656

Capítulo XXX. Era post COVID-19 661
José Manuel Cárdenas Gutiérrez, José del Carmen Aliaga Arauco, Guillermo Sequera y Alejandra Fernández-Jiménez
1. Aporte de la profesión farmacéutica ante la crisis: experiencia con la COVID-19 en México *(J.M. Cardenas)* 661
Introducción 661
1.1. Salud pública 662
1.2. Bioquímica clinica y biología molecular 662
1.3. Resultados en el transcurso de la pandemia 663
1.4. Farmacología y farmacia hospitalaria 663
1.5. Industria farmacéutica 664

2. Consecuencias de la complejidad de la pandemia en Sudamérica *(G. Sequera)* 664
3. Pandemia en el Perú, consecuencias en la salud y la educación de la población *(J. Aliaga)* 666
3.1. Salud 666
3.2. Educación 667
4. Aporte de la profesión farmacéutica ante la crisis sanitaria: experiencia con la COVID-19 en Costa Rica *(A. Fernández-Jiménez)* 668
4.1. Introducción 668
4.2. Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica (COLFAR) 668
4.3. Servicios de Farmacia de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) 668
4.4. Ministerio de Salud (MINSA) 670
4.5. Docencia desde la Facultad de Farmacia (FF), Universidad de Costa Rica (UCR) 671
4.6. Centro Nacional de Información de Medicamentos (CIMED) 672
In memoriam 672
Bibliografía 672

Capítulo XXXI. COVID-19: de pandemia a endemia 675

Juan Jesús Gestal Otero

1. Evolución de la pandemia de COVID-19 en España durante la fase de contención 675
2. Fase de mitigación 691
3. Evolución de la pandemia en la fase de mitigación 693
4. Fase de endemia 695
5. Fin de la pandemia en España 698
6. Evolución de la enfermedad en la fase de endemia 698
7. Recomendaciones vacunales frente a COVID-19 para el otoño invierno 2023-2024 700
8. Variantes del SARS-CoV-2 700
9. Uso de mascarilla 703
9.1. Abandono de la mascarilla en interiores 704
9.2. Fin de la obligatoriedad del uso de la mascarilla 704

Agradecimientos

Hoy día, en muchos aspectos, la pluridisciplinariedad es la regla. Deseamos dar las gracias a todos los autores de la obra *COVID-19: una aproximación pluridisciplinar*, que desarrollan su actividad en los ámbitos clínico, microbiológico, epidemiológico, y farmacológico, y a los restantes expertos que han hecho posible su realización. "Today, science has few borders, and collaboration is the name of the game" (Jalali-Hervay *et al.*). El agradecimiento es el medicamento del alma (A. Mingorance). Los autores se han implicado en la emergencia sanitaria que ha supuesto la irrupción de la COVID-19, con el consiguiente sacrificio en dedicación, tiempo y esfuerzo que ello ha supuesto, dándose cabida en el proyecto a las diferentes sensibilidades y variantes (ciencias de la salud y fisicoquímicas, técnicas, filología, derecho, ciencias de la educación, economía, turismo, modelización, periodismo, industria, etc.). El proyecto se ha conformado en torno a miembros de dieciocho Academias y Reales Academias de Ciencias, Artes y Letras, pertenecientes a veinticinco Instituciones y una docena de Universidades, españolas e iberoamericanas. Nuestra gratitud a las siguientes instituciones, organizaciones, editoriales o revistas, por las facilidades concedidas: American Chemical Society (ACS, Washington DC), Ars Pharmaceutica (Facultad de Farmacia; Universidad de Granada), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid), Editorial Elsevier (Ámsterdam), Real Academia Nacional de Farmacia de España (RANFE, Madrid), Revista de Administración Pública (Centro de Estudios Políticos y Constitucionales), Asociación de Letrados del Tribunal Constitucional, y Royal Society of Chemistry (RSC, Cambridge). También a las entidades que han contribuido a la cofinanciación de la obra: Fundación Prof. Vicente Callao Fabregat de la Academia Iberoamericana de Farmacia (Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, CACOF, y BIDAFARMA), Fundación Casares Gil de la Real Academia Nacional de Farmacia de España, Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla, Academia de Ciencias, Artes y Letras de Huelva, Academia de Ciencias Farmacéuticas de Brasil, Academia de Ciencias Farmacéuticas del Paraguay, Academia de Ciencias Matemáticas, Físicoquímicas y Naturales de Granada, Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Academia de Ciencias Veterinarias de Cataluña, Academia de Farmacia Santa María de España de la Región de Murcia, Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas de México, Academia Nacional de Farmacia de Perú, Centro de Investigaciones y Recursos Naturales, Salud y Medio Ambiente (RENSMA) de la Universidad de Huelva, Real Academia de San Dionisio de Ciencias, Artes y Letras de Jerez de la Frontera, Real Academia Sevillana de Ciencias, y Consejería de Universidad, Investigación e Innovación de la Junta de Andalucía. Nuestro reconocimiento por la excelente labor que desempañan a la antigua directora de la Editorial Universidad de Sevilla (EUS), Dra. Araceli López Serena, a la actual directora Dra. Elena Leal Abad, y al Jefe de Servicio D. Ángel Martínez Pérez. A Dña. María Ángeles Guil Soto, de Administración, y a la Unidad Técnica de la Editorial Universidad de Sevilla, que ha mostrado un gran interés en la confección de la obra, en especial a Dña. Amparo García Gras, encargada del proceso de edición, a Dña. Rocío Peña Lissen y Dña. Clara Isabel De Lima en las revisiones técnicas, y a D. Mateo Sánchez Sánchez por el tema de las gráficas, en los inicios. Finalmente al

Prof. D. Antonio Luis Doadrio Villarejo, presidente de la RANFE y del Instituto de España, por su continuo estímulo, a la Prof.ª Pilar Aranda Ramírez, rectora de la Universidad de Granada (2015-2023), por las recomendaciones efectuadas, al Prof. Dr. D. Vicente Larraga Rodríguez de Vera (CSIC), vicesecretario de la RANFE, especialista en vacunas de ADN recombinantes, por el apoyo prestado, y al Prof. Dr. D. Mariano Esteban Rodríguez (CSIC), presidente de Honor de la RANFE por sus consejos; nadie mejor dada su condición de virólogo y su implicación en el tema de las vacunas, entre ellas, la MVA-COVID-19(S) desarrollada por su equipo, para redactar el prólogo, que supone sin duda un broche de oro a esta obra pluridisciplinar e integradora.

Sevilla, a 12 de enero de 2026

Prólogo

Mariano Esteban
Profesor de Investigación Ad Honorem del CSIC en el Centro Nacional de Biotecnología, Académico Numerario y Presidente de Honor de la Real Academia Nacional de Farmacia

Desde su inicio a finales del año 2019, la pandemia producida por el coronavirus del tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) y de la enfermedad COVID-19 ha sido una de las mayores catástrofes que ha padecido la humanidad en la historia reciente, con unas tasas de infección hasta 2025 superiores a los 700 millones de personas y algo más de 7 millones de defunciones (en España ha provocado unas 125 000 muertes). Esta infección respiratoria se produjo de forma muy rápida afectando a todos los continentes en un período corto de unos tres a seis meses, con enormes pérdidas no solo en vidas, sino también económicas. La población se encontró desprotegida por carecer de conocimientos sobre la biología del virus, su forma de diseminación, afectación de los tejidos, replicación, consecuencias patológicas sobre los pulmones, tormenta de moléculas estimuladoras, papel del sistema inmune, patología del sistema nervioso central... lo que, junto a una carencia en métodos de seguimiento y control del virus, como antivirales y vacunas, provocó un desconcierto en los sistemas sanitarios al tiempo que los países más avanzados tomaban medidas rápidas de contención de la infección. Se puede decir que nunca antes en la historia de agentes patógenos como los virus causantes de epidemias y pandemias se ha avanzado tanto en la identificación del agente causal, así como en el desarrollo de estrategias de diagnóstico rápido y control de la infección con antivirales y vacunas.

Recopilar los acontecimientos científicos ocurridos durante la pandemia hasta finales del año 2025 en un solo libro representa un logro muy importante para todas aquellas personas interesadas en conocer en profundidad cómo se ha logrado semejante triunfo de la ciencia. Han sido los científicos, los sanitarios, la colaboración público-privada, las fundaciones, los gobiernos y la sociedad en general lo que ha permitido poder controlar, aunque no eliminar, la propagación de la infección y su mortalidad.

El libro titulado *COVID-19: una aproximación pluridisciplinar*, escrito por un amplio panel de profesionales en distintas áreas del conocimiento, expone una amplia gama de temas de gran interés para conocer lo que una pandemia representa para la humanidad. A través de treinta y un capítulos, los autores van desgranando una variedad de temas: historia de las epidemias, diagnósticos y análisis clínicos, lecciones aprendidas, el impacto de los animales, leguaje utilizado, evolución de la infección, modelos matemáticos, seguridad alimentaria, impacto económico, turismo, aprendizaje, legislación, industria farmacéutica, biología del virus, diagnósticos rápidos, métodos analíticos, bioquímica de la infección, desarrollo de antivirales, entorno medioambiental y vigilancia, puerta de entrada del virus, patología, tratamientos, diagnóstico precoz, nanopartículas, vacunas, antivirales, reglamentación, era post COVID-19 y situación actual endémica.

En su conjunto, el libro sobre COVID-19 representa una visión actualizada de la pandemia y sus consecuencias, con interés no solo para investigadores científicos y sanitarios, sino también para un público más general, con interés en conocer cómo se han abordado desde distintos frentes las consecuencias de un virus con tanto poder destructivo, al encontrarse con una población que no tenía su sistema inmune preparado. Mi felicitación a todos los autores y al coordinador del volumen, el profesor Agustín García Asuero, por el esfuerzo para llevar a término esta obra, que a buen seguro tendrá su impacto en distintos foros. Con mis mejores deseos.

Presentación

Agustín García Asuero FRSC
Profesor emérito por la Universidad de Sevilla
Académico de número de la Academia Iberoamericana de Farmacia
Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia (IdE)

La COVID-19 es el desafío sanitario más imponente que ha afrontado la humanidad en el siglo XXI. Las consecuencias fisiológicas, socioeconómicas y políticas generadas por la emergencia sanitaria han sido graves conduciendo a pérdidas económicas sustanciales. La pandemia ha demostrado que la preocupación por la salud pública no es solo un problema médico, sino que afecta a la sociedad en su conjunto, convirtiéndose en la principal preocupación científica. «Our normal daily things lost their importance» (Roser Valenti, físico teórico de la Universidad Goethe, Frankfurt). Es necesario aunar esfuerzos entre profesionales de la salud, médicos, farmacéuticos, veterinarios, odontólogos, biólogos, químicos, físicos, ingenieros y otros colegas multidisciplinares para contribuir a la solución de los problemas derivados de la COVID-19 y futuras pandemias, ayudando a prevenir numerosas muertes y desastres económicos y a mitigar las consecuencias sociales resultantes.

Diferentes disciplinas abarcan perspectivas de investigación complementarias conducentes a la observación, análisis, comprensión e interpretación de las consecuencias para la salud de la COVID-19 y futuras pandemias. Aunar los esfuerzos requiere la comprensión de conceptos interdisciplinarios y un conocimiento a fondo de los problemas planteados. La obra supone un intento de abarcar los aspectos concernientes a la COVID-19 desde una óptica pluridisciplinar dando cabido a diversos saberes, no solo a los científico-técnicos, sino también a las humanidades (filología y ciencias de la educación) y ciencias sociales y jurídicas (turismo, económicas y empresariales, derecho), atendiendo, como es primordial, a las ciencias de la salud, *i.e.* aspectos clínicos contemplados en un entorno hospitalario y con la medicina preventiva y salud pública, o relacionados con la industria.

Esta obra sobre la COVID-19 es heterogénea, amplia y plural; contempla desde cuestiones básicas a desarrollo de antivirales, tratamiento farmacológico, papel de las nanotecnologías en el diagnóstico y de forma extensa las vacunas frente al SARS-CoV-2, la solución principal frente a la pandemia. La obra va dirigida a especialistas en la materia, universitarios de las áreas implicadas e interesados, alumnos y público en general.

Capítulo I
Los suspiros y lamentos de Hades: en torno a la historia de las epidemias

Antonio González Bueno
Catedrático de Historia de la Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia (IdE)

INTRODUCCIÓN

> La ciudad [Tebas], como tú mismo puedes ver, está ya demasiado agitada y no es capaz todavía de levantar la cabeza de las profundidades por la sangrienta sacudida. Se debilita en las plantas fructíferas de la tierra, en los rebaños de bueyes que pacen y en los partos infecundos de las mujeres. Además, la divinidad que produce la peste, precipitándose, aflige la ciudad. ¡Odiosa epidemia, bajo cuyos efectos está despoblada la morada Cadmea, mientras el negro Hades se enriquece entre suspiros y lamentos! (Sófocles, *Edipo rey*, 20-30 *fide* Ramos Aguilar 2015: 84).

Con estas palabras un sacerdote de Tebas explica a Edipo, al comienzo de la tragedia de Sófocles (496 a. C.-406 a. C.), la crisis que atraviesa la ciudad, asolada por la guerra y la peste. No muy diferente es el relato que el historiador y militar ateniense Tucídides (*c.* 460 a. C.-*c.* 396 a. C.) nos transmite de la epidemia que atacó Atenas en el 431 a. C., cuando la ciudad se batía con Esparta por el control del Mediterráneo, un hecho del que él fue testigo presencial:

> No hacía aún muchos días que [los peloponesios] estaban en el Ática cuando comenzó a declararse por primera vez entre los atenienses la epidemia que, según se dice, ya había hecho su aparición anteriormente en muchos sitios, concretamente por la parte de Lemnos y en otros lugares, aunque no se recordaba que se hubiera producido en ningún sitio una peste tan terrible y una tal pérdida de vidas humanas. Nada podían hacer los médicos por su desconocimiento de la enfermedad que trataban por primera vez; al contrario, ellos mismos eran los principales afectados por cuanto que eran los que más se acercaban a los enfermos; tampoco servía de nada ninguna ciencia humana... (Tucídides, *La Guerra del Peloponeso*, 463-464 *fide* Juan José Torres Esbarranch 1990: 167-168).

Siglos atrás, los textos véterotestamentarios de *Isaías* relatarán la decisión de Senaquerib, rey de Asiria, de abandonar su intento de conquistar Jerusalén, en 700 a. C., debido al castigo con el que un ángel de Jehová desmanteló su ejército:

> Y salió el ángel de Jehová y mató a ciento ochenta y cinco mil en el campamento de los asirios; y cuando se levantaron por la mañana, he aquí que todo era cuerpos de muertos. / Entonces Senaquerib rey de Asiria se fue, e hizo su morada en Nínive... *(Isaías*, 37, 36-38).

Estas y otras referencias históricas de cariz similar señalan, bien a las claras, el impacto de los brotes epidémicos sobre el discurrir de la historia. El canadiense William-Hardy McNeill (1917-2016) ha argumentado que la propagación de enfermedades infecciosas ha sido un factor importante en el desarrollo histórico, social y económico de la humanidad; desde las plagas del reinado de Antonino, en el siglo II, al colapso del imperio Han en la China del siglo III, la peste negra que azotó Europa entre 1346 y 1350, con brotes recurrentes durante más de trescientos años como la gran peste de Londres (1665-1666), la plaga italiana (1629-1631) o la peste bubónica desarrollada en la Francia del comienzos del XVIII (1720-1722) (McNeill 1976).

El término «epidemia» hunde sus raíces en el griego ἐπιδημία [epidêmía], etimológicamente «visita» o «llegada» a un lugar (Pino y Hernández 2008), un bello eufemismo para referirse a lo que, a lo largo de los tiempos,

conoceremos como una enfermedad que afecta a una gran parte de la población, un término algo impreciso que suele ser sustituido por el de «enfermedades sociales», caracterizadas por una alta tasa morbimortalidad y, por ende, de alarma social e importante gasto público.

En los autores griegos, de acuerdo con lo señalado por Pedro Laín (1970), el término «epidemia» queda reducido, al menos en los textos del *Corpus Hippocraticum*, a la visita que practica el médico *in itinere* a un paciente, bien en su propia consulta (*iatreîon*) bien en el domicilio del paciente, aunque, en algunos pasajes, el término parece ajustarse mejor a la utilización actual. Para referirse al concepto que hoy entendemos como «epidemia», los clásicos emplean el término «o loimós» [ὁ λοιμός], versionado al latón como *pestis*, un vocablo que designa a cualquier enfermedad epidémica o pandémica, al contagio infeccioso y, también, a la insalubridad y podredumbre, a su olor nauseabundo, y a cualquier azote, ruina, catástrofe o calamidad de gran proporción.

1. UNA CUESTIÓN DIVINA

Las epidemias, como la mayor parte de las enfermedades generadas sin causas evidentes, fueron inicialmente atribuidas a un castigo divino motivado por una conducta inmoral de la sociedad o un enfado de los dioses. Así se relata en *Éxodo*:

> Jehová dijo a Moisés y Aaron: Coged puñados de ceniza de horno y espárzala Moisés hacia el cielo a vista de Faraón y se convertirá en polvo menudo en toda la tierra de Egipto de lo que resultarán tumores apostemados así en los hombres como en las bestias (*Éxodo*, 9, 5).

No muy diferente es el relato ofrecido por Hesíodo (*c.* 700 a. C.) en sus *Trabajos y días*:

> Sobre ellos desde el cielo hace caer el Cronión una terrible calamidad, el hambre y la peste juntas, y sus gentes se van consumiendo (Hesíodo, 243, *fide* Pérez Jiménez 1978: 137).

Y Platón (c. 427-347 a. C.) nos explicita su causa en las líneas de su *Banquete*:

> Pero cuando en las estaciones del año prevalece el Eros desmesurado, destruye muchas cosas y causa un gran daño. En efecto, las pestes suelen originarse de tales situaciones y, asimismo, otras muchas y variadas enfermedades entre los animales y las plantas (Platón, 188.b.1, *fide* Marcos Martínez 1986: 219).

Una consideración divina del mal, objeto de la falta de mesura en el comportamiento humano, que supuso un obstáculo para su prevención y control.

La solución contra esta maldición divina fue la súplica, la oración y la penitencia colectiva como único sistema de implorar el perdón divino. El movimiento de los flagelantes, una secta generada en la Italia medieval, prohibida en 1350 por el papa Clemente en la bula *Inter Sollicitudines*, alcanzó, pese a todo, un florecimiento excepcional en los años centrales del XV, a raíz de la epidemia de peste negra, abandonando el ámbito privado para invadir las calles en sangrientas procesiones de carácter público. Las razones que llevaban a esta hermandad a castigar su cuerpo eran la expiación de sus pecados –y los del resto de la humanidad– en un intento de aplacar la ira divina mediante la penitencia (Vandermeersch 2004).

Estos remedios espirituales, las mortificaciones, confesiones y desagravios públicos, fueron acompañados de otras medidas de carácter «profiláctico» como la expulsión de las ciudades de pobres, prostitutas, delincuentes y cualquier otra figura que contradijera la moral del Medioevo. Un proceso de segregación acentuado con la construcción de espacios, alejados del entorno urbano y monástico, donde estos apestados, o cualquiera otro que mostrara síntomas compatibles con la epidemia, eran encerrados.

2. ENTRE LA REALIDAD FÍSICA DEL CONTACTO Y LA CONSISTENCIA ETÉREA DEL AIRE

Cómo prevenir la llegada de una epidemia y cómo tratarla se convirtieron en temas de interés de primer orden desde tiempos ancestrales: Hipócrates, Galeno y Avicena se ocuparon de ello en sus escritos; los tratados sobre las epidemias suman legión con anterioridad a la peste del XIV y se multiplican durante los años de esta, tanto en latín como en las más diversas versiones populares. Una de las más antiguas producidas en lengua vulgar se debe a Jacme d'Agramunt un médico del siglo XIV, docente en el Estudi General de Lérida, autor de un *Regiment de preservació a epidímia e pestilència e mortaldats*, entregado al alcalde de la localidad el 23 de abril de 1348, donde señalaba cuándo y cómo protegerse de una plaga, de la que él mismo habría de fallecer meses después. En su texto alude a medidas como el confinamiento, la desinfección, la limpieza de calles y la ventilación de las casas y explica la causa del mal como una mala confluencia de los astros capaz de originar cambios sustanciales en el aire (Winslow y Duran-Reynalds 1949), una hipótesis ya presente, esta de la confluencia de los astros, en el pensamiento de Aristóteles.

El aire se convirtió, desde los textos hipocráticos, recuérdese su influyente obra *Sobre los aires, aguas y lugares* (López Pérez 1984), en el factor transmisor por excelencia

de las enfermedades pestilentes; su purificación, mediante sahumerios, fue uno de los métodos colectivos más empleados para depurarlo; los incensarios unían así una doble acción terapéutica: la espiritual, de honrar a los dioses, presente ya en los templos judíos y griegos, y la material, de limpiar las impurezas distribuidas en el ambiente. En *De theriaca ad Pisonem*, un texto tradicionalmente atribuido a Galeno (*c.* 129-*c.* 201/216), se lee:

> ... la peste, mata de mala manera no a unos pocos, sino a ciudades enteras cuando se propaga, y es una forma penosa de poder morir por el aire, y como los hombres no pueden huir del peligro porque tienen la necesidad de respirar, aspiran el aire como un veneno hacia el interior de su cuerpo. Por esta razón elogio al muy admirado Hipócrates [...] la curó no de otra manera sino apartando y alterando el aire a fin de que no fuera ya tal y se pudiese respirar. En efecto, habiendo ordenado encender un fuego por encima de toda la ciudad, no simplemente con la leña de hoguera, sino también con la de las coronas y flores más olorosas, decidió que tales materiales fueran el alimento del fuego y que se le avivara con los más perfumados ungüentos y que tuviera un agradable olor, para que, purificado así el aire, los hombres respirasen hasta que se hubiese alejado... (Galeno, 14, 281, 2-9, *fide* Pino y Hernández 2008: 198-199).

Las teorías humorales de origen hipocrático-galénico, que dominaron las culturas mediterráneas hasta bien entrado el siglo XVI, centraron sus prácticas individuales en cauterizaciones, sudoración, purgantes y eméticos, elementos con los hacer expulsar los humores espesos que no podían ser eliminados por los mecanismos de excreción normales. Se unían a estas las de carácter social, proclamadas desde los ayuntamientos, basadas en la segregación: bien expulsando a los posibles contagiados, bien cerrando la ciudad –y a los habitantes en sus casas– para que la enfermedad no pudiera llegar hasta ellos. Estos partidarios del contagio, explicaban la proliferación de la enfermedad como producto del contacto directo y, por ende, defendían todas las medidas profilácticas establecidas desde la antigüedad: aislamiento, cuarentenas, lazaretos, quema de enseres, etc.

El humanista Giovanni Boccaccio (1313-1375) nos ofrece una descripción de la situación vivida en la Florencia de 1348 en los prolegómenos de la primera jornada de su *Decamerón*... que constituye una magnífica síntesis de lo comentado líneas arriba:

> Digo, pues, que [...] llegó la mortífera peste que o por obra de los cuerpos superiores o por nuestras acciones inicuas fue enviada sobre los mortales por la justa ira de Dios para nuestra corrección [...] y no valiendo contra ella ningún saber ni providencia humana (como la limpieza de la ciudad de muchas inmundicias ordenada por los encargados de ello y la prohibición de entrar en ella a todos los enfermos y los muchos consejos dados para conservar la salubridad) ni valiendo tampoco las humildes súplicas dirigidas a Dios por las personas devotas no una vez sino muchas ordenadas en procesiones o de otras maneras, casi al principio de la primavera del año antes dicho empezó horriblemente y en asombrosa manera a mostrar sus dolorosos efectos [...] y para curar tal enfermedad no parecía que valiese ni aprovechase consejo de médico o virtud de medicina alguna; así, o porque la naturaleza del mal no lo sufriese o porque la ignorancia de quienes lo medicaban [...] no supiese por qué era movido y por consiguiente no tomase el debido remedio [...] y más allá llegó el mal: que no solamente el hablar y el tratar con los enfermos daba a los sanos enfermedad o motivo de muerte común, sino también el tocar los paños o cualquier otra cosa que hubiera sido tocada o usada por aquellos enfermos, que parecía llevar consigo aquella tal enfermedad hasta el que tocaba [...] Muchos otros [...] saliendo a pasear llevando en las manos flores, hierbas odoríferas o diversas clases de especias, que se llevaban a la nariz con frecuencia por estimar que era óptima cosa confortar el cerebro con tales olores contra el aire impregnado todo del hedor de los cuerpos muertos y cargado y hediondo por la enfermedad y las medicinas... (Boccaccio, Jornada primera *fide* Blanch 1876: 5-6).

La historiografía atribuye a Charles de Lorme (1584-1678), un médico francés que ejerció en varias Cortes europeas durante el siglo XVII, el diseño de un traje con el que el terapeuta pudiera evitar el contagio al tratar a los apestados; consistía en una largo abrigo de cuero, cubierto de cera perfumada, que llegaba hasta los pies; la extremidades se cubrían con botas, guantes y sobre la cabeza portaba un sombrero de cuero de cabra, que permitía identificar al individuo como médico. La cara se cubría con una enorme máscara con anteojos de la que sobresalía una nariz con forma de pico de ave, de medio pie de largo (*c.* 30 cm); este enorme pico estaba relleno con triaca, un polifármaco de efecto panacea, que contenía un buen número de plantas medicinales que cumplía la doble función de proteger al médico y de evitar los olores que desprendían los cuerpos de los afectados por la peste. La indumentaria del «doctor de la peste» se completaba con un bastón con el que podía mantener a distancia al paciente y señalarle las indicaciones pertinentes (Cipolla 1977; Byrne 2006).

3. LOS MIASMAS Y LOS CORPÚSCULOS

En los talleres tipográficos de los herederos de Lucantonio Giunta, en la Venecia del 1546, se publicó *De contagione et contagiosis morbis et curatione libri III,* un texto debido a la pluma del médico y humanista veronés Girolamo Fracastoro (1478-1553) dedicado al cardenal Alessandro Farnese (1520-1589). En la propia dedicatoria alude a la conveniencia de la lectura previa de un pequeño introito, que titula «De sympathia et antipathiarerum

liber I», donde formula un mecanismo de trasmisión de las enfermedades para explicar las situaciones de contagio a distancia.

El autor simula la existencia de unas *seminaria contagiorum* las cuales, atendiendo a un principio selectivo de actuación, quedan dotadas de un efecto específico sobre el hospedante, en función de la «analogía» que presenten frente al objeto infectado. De modo que estas partículas contagiadoras actuarían según los principios de atracción o repulsión. De alguna manera, esta idea de las «semillas del contagio» estaba ya presente en otros neoplatónicos florentinos, Marsilio Ficino, entre ellos (Henríquez 2017).

De contagione... está organizado en tres «libros». El primero explica el mecanismo de contagio, cómo se puede llevar los *seminaria* a distancia y por qué solo algunas enfermedades son contagiosas. En el segundo describe una amplia panoplia de las enfermedades calificadas en el Renacimiento como contagiosas: peste, lepra, tisis, sarna, rabia, erisipela, viruela, ántrax, tracoma, tifus exantemático y sífilis; para cada una de ellas presupone la existencia de un tipo específico de «semilla de contagio». En el tercer libro se ocupa del tratamiento de las enfermedades contagiosas, con comentarios sobre la propagación y el control de las epidemias. Fracastoro describe así la multiplicidad y especificidad de las *seminaria contagiorum:*

> Múltiples y muy admirables son las analogías de los contagios, una peste daña árboles o los campos, pero no daña a ningún ser animado; al contrario, otra ataca a los seres animados y perdona a los campos y a los árboles. Y entre los seres animados una ataca al hombre, otra a los bueyes, otra a los caballos o a otros seres. Pero también en la misma especie, un contagio que ataca a los niños y a los jóvenes, y no daña a nadie entre los viejos y viceversa; ni aquel que daña a los hombres, daña siempre a las mujeres. Algunas pestes actúan promiscuamente, así algunos adquieren ciertas enfermedades y otros no. También los órganos tienen sus propias analogías. La legaña no daña a otros órganos sino a los ojos; la tisis, no daña a los ojos que son delicados y en cambio ataca a los pulmones [...] También entre los humores uno sufre una clase de contagio pero no otros, y también todos pueden ser atacados... (*De contagione*, I, 8, *fide* Ruiz Moreno 1962: 24).

Los seguidores de esta teoría miasmática defendían la propagación de las pandemias en razón de la mayor o menor predisposición, individual y colectiva, al agente morboso, vinculada tanto a cuestiones geográficas y ambientales como a la propia cualidad genética de los individuos.

Poco más podía hacerse sin conocer la causa efectiva del mal y, para ello, habría de disponerse de los medios técnicos y la capacidad interpretativa necesaria. Habría que esperar a mediados del siglo XVIII para que las teorías de Fracastoro cobraran un nuevo sentido.

4. INOCULACIÓN E INMUNIZACIÓN

La viruela es una de las enfermedades contagiosas que ha afectado a seres humanos durante miles de años. La técnica de inoculación de la viruela se había extendido desde Oriente a las regiones del Caspio, donde fue conocida por la aristócrata y viajera británica *lady* Mary Wortley Montagu (1689-1762), quien se ocupó de propagarla, desde Gran Bretaña, al resto de las Cortes europeas. Giovanni-Angelo Gatti (1724-1798), un médico de origen toscano, establecido en París desde 1761, fue un fiel defensor de la teoría de la inmunización, no así un importante grupo de médicos parisinos quienes habían definido las inoculaciones como «fuentes de contagio» y la causa de las más recientes epidemias que habían azotado a la capital francesa. En 1764 Angelo Gatti dio a la prensa su *Réflexion sur les prejugés qui s'oposent au progrès et à la perfection de inoculation* (Bruxelles: Chez Musier fils), obra en cuatro capítulos destinada a demostrar la falsedad de los prejuicios de sus acusadores y, tres años después, *Nouvelles reflexions sur la pratique de inoculation* (Bruxelles: Chez Musier fils, 1764), donde se planteaba como objetivo elegir la mejor manera de realizar una inoculación. La disputa sobre el empleo de la inoculación llegó al Parlement de Paris quien solicitó a la Facultad de Medicina un informe sobre el grado de peligro de esta práctica, la cual fue declarada admisible en enero de 1768 (Massai 2008). Angelo Gatti empleó el término «virus» para referirse al agente varioloso, un término de origen latino, habitualmente empleado para designar un bebedizo de plantas con efecto venenoso.

En 1798 el médico inglés Edward Jenner (1749-1823) hizo imprimir *An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae...* (London: printed for the author by Sampson Low), donde dio a conocer que la inoculación con los fluidos obtenidos de las lesiones de la viruela bovina era capaz de prevenir la infección de la viruela en seres humano (Razzell 1977). Sus postulados, aceptados con rapidez en la Europa del gozne entre los siglos XVIII y XIX, llevó a la Corona española a financiar la Real Expedición Filantrópica de la Vacuna, dirigida por el médico y cirujano militar Francisco Javier de Balmis y Berenguer (1753-1819), llevada a cabo entre 1803 y 1806, cuyo objetivo fue que la inoculación de la viruela alcanzase todos los rincones del Imperio español (Balaguer y Ballester 2003).

5. CUESTIÓN DE HIGIENE

En los años centrales del XIX, el químico bávaro Joseph Pettenkofer (1818-1901) hizo público su *Untersuchungen und Beobachtungen über die Verbreitungsart der Cholera* (Múnich, 1855), un escrito donde relacionó la

presencia de epidemias, particularmente el cólera, con la composición del suelo, por lo que recomendaba seguir una serie de medidas de higiene práctica entre las que se encontraban el procurarse lugares con buen agua, aire fresco y una correcta eliminación de las aguas residuales (Ledermann 2003). Su pensamiento sobre el origen de las epidemias es sustancialmente contrario a las nuevas ideas que mantenían el concepto de que las bacterias eran la causa principal de las enfermedades, y al que habremos de referirnos con prontitud.

Sus ideas higienistas se entroncan dentro de un movimiento socio-cultural, gestado durante la primera mitad del XIX, que llevó a los gobernantes a interesarse por la salud de sus ciudades, como colectivo, frente a los casos de la individualidad del ser enfermo.

Es cierto que este interés por las condiciones de salud medio-ambientales y su relación con la presencia habitual de epidemias en un ámbito territorial determinado está presente en el pensamiento hipocrático e influyó, de manera decisiva, en las resoluciones de ingenieros, arquitectos y agrónomos romanos, como Marcus Terentius Varro (116-27 a. C.) Marco Vitruvio (80-15 a. C.) o Lucius Junius Moderatus Columella (4-*c.* 70), en sus proyectos. La novedad del pensamiento higienista estriba en considerar la enfermedad como un fenómeno social que implica todos los aspectos de la vida humana y que supone diseñar un amplio conjunto de medidas que permitan mantener un medio saludable en el ambiente de la ciudad: instalación de agua corriente, cloacas, iluminación en las calles y, con ello, la capacidad de poder controlar las epidemias y sus procesos de difusión.

La salud deja de ser un problema individual para transformase en un compromiso de los gobernantes gestado durante el liberalismo y cuyas raíces se encuentran en las revoluciones sociales de la Europa del XVIII. Ya en 1790 el médico pavesano Johann Peter Frank (1745-1821) había publicado *De populorum miseria: morborum genitrice* (*Delectus Opusculorum Medicorum* [Ticini], *9:* 302-324), cuya influencia en autores posteriores, como el cirujano inglés Charles-Turner Thackrah (1795-1833), el abogado y economista londinense Edwin Chadwick (1800-1890) o el médico prusiano Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821-1902) incorporaran estas ideas para erradicar enfermedades como el cólera o la fiebre amarilla, afecciones más frecuentes en el medio urbano y entre los grupos trabajadores, cuyas condiciones insalubres tanto de sus hábitats como de sus espacios de trabajo eran auténticos focos de diseminación de epidemias (Ramos 2014).

Será en la segunda mitad del XIX cuando se generalice la hipótesis del origen ambiental de las enfermedades epidémicas y la necesidad de proteger los tres elementos básicos que constituían un ambiento puro: el aire, el agua y el Sol. Un estado de adecuada pureza de estos tres elementos permitiría alejar a las «miasmas» y «corpúsculos» que, procedentes de cuerpos enfermos o sustancias en descomposición, lograban hacer enfermar a los habitantes de las ciudades.

A las medidas higiénicas propulsadas por los gobernantes, tales como eliminar las áreas fangosas, alejar los mataderos de los centros urbanos o trasladar los cementerios a las periferias, siguieron otras, de índole privada, como la instalación de baños en las viviendas, la regulación de la ventilación natural o la limpieza periódica de los espacios habitables.

Avanzado el último cuarto del siglo XIX, los estudios de Louis Pasteur y Robert Koch, figuras destacadas de sendas cohortes de colaboradores, permitirán concluir que la etiología de las enfermedades infecciosas se relacionaba con microorganismos y no con «miasmas» emanados de cuerpos en descomposición. Para entonces la higiene se había convertido ya en una mera cuestión social.

6. MICROBIOLOGÍA Y BACTERIOLOGÍA

Nuestra concepción de la historia suele llevarnos a señalar elementos totémicos, entes referenciales sobre los que interpretar nuestro pasado; en el caso que nos ocupa estas figuras son Louis Pasteur (1822-1895) y Robert Koch (1843-1910), quienes aúnan a su indiscutible rol como generadores de nuevos conocimientos, una polémica personal y profesional que los ha hecho especialmente atractivos como elementos de estudio (Sáez Gómez 2004; Metchnikoff 2006; Fernández Telleiro 2008).

En el verano de 1877, el químico francés Louis Pasteur fue requerido por el Ministère de l'Agriculture para investigar el origen del carbunco, una enfermedad que mata a los animales tras una fuerte hemorragia de sangre negra. Louis Pasteur era, pese a sus pocos más de cincuenta años, un catedrático jubilado, miembro de Académie Nationale de Médecine desde el 25 de marzo de 1873. Tenía a sus espaldas una larga experiencia investigadora: desde 1857 hasta 1865 había orientado sus estudios hacia los procesos fermentativos; en el inicio de mayo de 1865 había presentado a la Académie des Sciences un «Procédé pratique de conservation et d'amélioration des vins» y, en 1871, había estudiado las alteraciones de las cervezas; las cuales, al igual que en los vinos, eran causadas por unos microorganismos distintos de las levaduras que las producían.

Los primeros resultados sobre el origen de la enfermedad del carbúnculo fueron presentados, en abril de 1878, ante la Académie des Sciences, junto a Jules-François Joubert (1834-1910) y Charles-Édouard Chamberland (1851-1908), bajo el significativo título de «La théorie des germes et ses applications a la médicine et a la chirurgie».

Para definir el agente causante de la enfermedad emplearon el término «microbio», acuñado por el cirujano francés Charles-Emmanuel Sédillot (1804-1883) en 1878 y consagrado por Émile Littré (1801-1881) en la sexta edición de su *Dictionnaire de médecine, de chirurgie, de pharmacie, de l'art vétérinaire et des sciences qui s'y rapportent* (Paris: Librairie J.-B. Baillière et fils, 1886).

Por estas mismas fechas, en el otoño de 1876, en Wollstein, una pequeña localidad prusiana, un joven médico rural, Robert Koch, de algo más de treinta años, también se interesa por las causas que provocan el carbunco. Koch había cursado sus estudios de Medicina en Gotinga, donde recibió las enseñanzas de Jacob Henle (1809-1885), uno de los primeros etiopatólogos, autor de *Von den Miasmen und Kontagien und von den miasmatisch-kontagiösen Krankheiten* (Berlín: Verlag von August Hirschwald, 1840), un texto donde sostiene el origen microbiano de las enfermedades infecciosas y la especificidad de los gérmenes que las provocan.

Siguiendo los pasos del francés Casimir-Joseph Davaine (1812-1882), quien había puesto de manifiesto que la sangre de un animal con ántrax transmitía la enfermedad a otros, cultivó los bacilos en suero sanguíneo; adicionó sangre de animales enfermos a caldos gelatinizados y esterilizados por ebullición y repitió el proceso de aislamiento: traspasó gotas del cultivo a un caldo limpio, hasta conseguir un cultivo puro de bacilos. El procedimiento le permitió cultivar un tipo específico de microorganismo. Tras inocular los cultivos en cobayas, logró provocar en ellos el ántrax: incluso después de muchas transferencias de cultivo, la bacteria podía causar la enfermedad cuando se re-inoculaba a un animal sano. El 22 de abril de 1876 Koch escribirá a Ferdinand Cohn (1828-1898) profesor de Fisiología vegetal en la Universidad de Breslau, interesado por el mundo bacteriano desde años atrás. En su escrito le solicita una entrevista para exponer sus hallazgos. El 30 de abril de este 1876, en presencia de Cohn y otros profesores como Karl Weigert (1845-1904) o Julius Cohnheim (1839-1884), efectuará una demostración de sus trabajos, que duró tres días, y que ha pasado a considerarse histórica. Meses más tarde publicará, en el segundo volumen de las *Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, su artículo sobre «Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus anthracis». Destinará los siguientes tres años a cimentar los fundamentos de lo que serán las modernas técnicas bacteriológicas: tal, los métodos de coloración con anilina, iniciados por Paul Ehrlich (1854-1915) o la óptica del microscopio utilizando aceite de cedro para el objetivo de inmersión; también supo aplicar su afición por la fotografía a la microscopía para obtener microfotografías. Trabajará sin salir de Wollstein, donde dispuso de un laboratorio privado. En 1878, junto a Karl Weigert y Ferdinanad Cohn, publica un trabajo en el que afirman que a cada tipo de infección corresponde un microorganismo específico; con ello se pone fin a la teoría del polimorfismo bacteriano. Sentaba así las bases de los que habrían de ser conocidos como «postulados de Koch», finalmente aplicados al resto de las enfermedades infecciosas. Para ello se basó en conceptos descritos anteriormente por quien había sido uno de sus maestros, Friedrich Gustav Jakob Henle (1809-1885). Estos postulados ayudan a entender cómo es la relación entre los agentes patógenos y las enfermedades. Había nacido una nueva disciplina: la Bacteriología. En el verano de 1880, Robert Koch se traslada a Berlín; sus investigaciones sobre el carbunco le hicieron merecedor de un puesto en el Kaiserliche Abteilung für Hygiene de Berlín; sus esfuerzos se dirigieron a la obtención de un medio sólido donde fuera posible el cultivo de microorganismos, tras sucesivos intentos encontró el sustrato adecuado: gelatina. La técnica abre un nuevo camino al estudio de la microbiología.

Sus investigaciones fueron pronto conocidas por Louis Pasteur; se confirmaban así las hipótesis del químico francés sobre el origen de las enfermedades, causadas por microorganismos, al igual que las fermentaciones. Pasteur reprodujo el experimento de Robert Koch, comprobó así que la bacteria del carbunco transmite la enfermedad; en 1877, junto a Jules François Joubert (1834-1910), puso de manifiesto que los bacilos del carbunco crecían con rapidez cuando se inoculaban en orina esterilizada, pero que no se multiplicaban y morían pronto cuando una de las bacterias presentes en el aire se introducía en la orina. Este antagonismo fue hecho público en los *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* bajo un lema que acabaría pasando a la historia: «la vida destruye a la vida»; los autores afirman en este trabajo que «estos hechos tal vez justifican las más amplias esperanzas para la terapéutica». No estuvieron errados, sus estudios abrían paso al futuro desarrollo de los agentes antimicrobianos.

En los años siguientes a la publicación del artículo de Louis Pasteur y Jules François Joubert se dieron a conocer varias investigaciones que corroboraron sus asertos; el italiano Arnaldo Cantani (1837-1893) empleó, en 1885, un cultivo de *Bacterium thermo* para tratar un caso de tuberculosis pulmonar; los alemanes Rudolph Emmerich (1852-1914) y Oscar Löw (1844-1941) utilizaron, con fines terapéuticos, en 1889, la «piocinasa», una sustancia antibiótica obtenida de *Penicillium aeruginosa*, inhibidora de cocos y bacilos patógenos, ampliamente utilizada durante las dos décadas siguientes. Las sugerencias teóricas de Pasteur y Joubert habían entrado, de lleno, en el terreno de la práctica.

Las relaciones personales y profesionales entre Robert Koch y Louis Pasteur fueron algo más que distantes,

de su virulencia se hicieron amplio eco tanto las revistas científicas como la prensa ilustrada. En cualquier caso, y quizás gracias a esta polémica, tuvo carta de naturaleza una nueva disciplina científica: la microbiología.

7. VACUNAS Y SUEROS

En la primavera del 1881, un 5 de mayo, Louis Pasteur inicia en Pouilly le-Fort, en la región francesa de Sena y Marne, una demostración pública de su vacuna frente al carbunco; ayudado por Charles Chamberland (1851-1908) y Émile Roux (1853-1933) suministró, a un lote de treinta carneros, tres dosis de cultivos atenuados con un grado creciente de virulencia, el otro lote no fue vacunado. La primera inoculación tuvo lugar a comienzos de mes, la segunda a mitad y la última y definitiva a final de mes. Se suministró el cultivo virulento a ambos lotes; todos los animales vacunados sobrevivieron a la enfermedad; los no vacunados perecieron. En junio de este 1881, Louis Pasteur expuso la experiencia en la Académie des Sciences:

> Poseemos ahora vacunas contra el carbunco, que, no siendo mortales por sí mismas preservan a los animales de la enfermedad mortal. Son vacunas vivas, cultivadas a voluntad, que pueden transportarse a cualquier parte, sin que se alteren. Su método de preparación puede llegar a ser general [...] puede decirse que la vacuna contra el carbunco constituye un adelanto evidente con respecto de la vacuna de Jenner, por cuanto esta no ha sido obtenida experimentalmente hasta ahora (Pasteur *fide* González y Ramos 2010: 117).

La epidemia de cólera de 1883 volverá a poner en escena los trabajos de los equipos de Louis Pasteur y Robert Koch. El inicio del foco epidémico se sitúa en el delta de El Cairo, territorio bajo la influencia francesa. El gobierno galo enviará una expedición científica dirigida por Émile Roux, discípulo de Pasteur, a quien sus sesenta años ya cumplidos no le permiten participar en la empresa. Sí lo hará Robert Koch encargado de dirigir la misión germana, la cual partirá hacia Alejandría el 24 de agosto; pocos días antes, el 15 de agosto, la misión francesa había llegado a esta ciudad. Tras el final de la epidemia colérica, Robert Koch y su equipo siguió estudiando la posible causa de la enfermedad; se trasladó a la India para proseguir con sus investigaciones.

En Calcuta, Robert Koch diseña un programa preciso de trabajo: autopsia y análisis microscópico de cadáveres, análisis biológico de gérmenes, estudio de su comportamiento en medio artificial, búsqueda en agua, tierra y aire y estudios estadísticos. Tres semanas después encuentra un bacilo, en forma de coma, que no aparece más que entre los coléricos y que ha logrado cultivar en gelatina: lo describe como *Vibrio cholerae*. Tras su vuelta, en 1885, la Friedrich-Wilhelms-Universität de Berlín funda el Institut für Hygiene und Umweltmedizin del que Robert Koch es nombrado su director y profesor. El Instituto de Higiene berlinés se convirtió en el centro de especialización de médicos interesados en bacteriología de todo el mundo.

A solicitud del propio Louis Pasteur, la Académie des Sciences puso en marcha, en los inicios de 1886, un proyecto internacional destinada a fundar, en París, un instituto privado destinado a la investigación y al tratamiento de las enfermedades infecciosas, un establecimiento autónomo, formado por personal civil y con la triple misión de actuar como dispensario para tratar la rabia, un centro de investigación y un espacio de formación docente superior. Un decreto de 4 de junio de 1888, firmado por el presidente de la República francesa, Jules Grévy (1807-1891), reconocerá el Institut Pasteur como institución de utilidad pública. El edificio fue inaugurado el 14 de noviembre de 1888. Para conformar el primer equipo del Instituto, Pasteur diseñó cinco laboratorios, con sus correspondientes servicios. El de microbiología general fue dirigido por Émile Duclaux (1840-1904); el de microbiología médica quedó dividido en dos secciones: la parte técnica fue asumida por Émile Roux (1853-1933) y la de investigación por Nicolai Gamaleia (1859-1949), antiguo director del Instituto de la Rabia de Odesa; el laboratorio de microbiología morfológica estuvo dirigido por Elie Metchnikoff (1845-1916); el servicio de rabia le fue asignado a Joseph Grancher (1843-1907) y el servicio de vacunaciones a André Cantemesse (1851-1919). Ni que decir tiene que el cargo de director fue asumido por Louis Pasteur, quien –hasta que sus fuerzas se le permitieron– acostumbraba a acudir al Instituto y solía estar al corriente de los trabajos que en él se realizaban.

El Gobierno alemán construirá, en Berlín, un centro similar al Instituto Pasteur: el Königlich Preußisches Institut für Infektionskrankheiten, inaugurado el 1 de julio de 1891, posteriormente conocido como Robert Koch-Institut. El centro estuvo bajo la dirección de Robert Koch hasta 1904. Inicialmente, el Instituto quedó ubicado en Berlín-Mitte, junto al Charité, el hospital más grande y antiguo de la ciudad.

Los trabajos de Louis Pasteur y Robert Koch, apoyados por sus correspondientes equipos, abrirán una nueva era en el estudio de las enfermedades. Ambos posibilitaron un cambio rotundo en la forma de entender la realidad y la vida, un nuevo paradigma en el que las explicaciones clásicas de la enfermedad infecciosa dejan su lugar a las fundamentadas en las causas microbiológicas.

La elaboración de vacunas con finalidad preventiva sentó las bases para investigar sobre la naturaleza de

las respuestas defensivas elaboradas por el cuerpo humano contra las agresiones provocadas por los microbios. Sobre estos nuevos pilares, entre los que destacan los trabajos realizados por Paul Ehrlich (1854-1915) e Ilya Mechnikov (1845-1916), se inició una nueva disciplina, la Inmunología, y se desarrollaron nuevos agentes terapéuticos y profilácticos: las antitoxinas.

La inmunización mediante sueros se desarrolló en la última década del siglo XIX; en buena parte gracias a los trabajos llevados a cabo por Émile Roux (1853-1933) y Alexandre Yersin (1863-1943) en el Laboratoire Pasteur y a los de Emil Adolf von Behring (1854-1917) y Shibasaburo Kitasato (1852-1931), en el Instituto berlinés de higiene fundado por Robert Koch. Los sueros terapéuticos o antitoxinas contenían los anticuerpos generados por la sangre de animales, generalmente caballos, en respuesta a la inoculación de toxinas; las antitoxinas diftérica y tetánica, las dos primeras comercializadas, comenzaron a producirse en 1892, pero su producción masiva no tuvo lugar hasta 1915, tras el estallido de la primera Gran Guerra, como medida preventiva empleada por el Ejército alemán.

8. COROLARIO

Desde los más remotos tiempos la humanidad ha sido consciente –y sufriente– de las enfermedades epidémicas; bajo diversas mentalidades se ha intentado analizar sus causas y desarrollar posibles remedios.

Las explicaciones clásicas ahondan en dos visiones sobre el origen de las enfermedades infecciosas: bien en relacionar los síntomas con las lesiones anatómicas, bajo el prisma de una concepción anatomo-fisiológica; bien en interpretar la enfermedad epidémica como un trastorno energénico o material del organismo, bajo una visión fisiopatológica.

En el último cuarto del siglo XIX se abre paso un nuevo paradigma en el que estas explicaciones clásicas de la enfermedad infecciosa dejan su lugar a las fundamentadas en las causas microbiológicas. La enfermedad pasa a ser interpretada en términos etio-patológicos; esto es, se abandona una visión antropocéntrica –el daño sobre el cuerpo– para dirigir la vista hacia el causante del mal: los agentes patógenos. Un cambio de paradigma que abrió una nueva puerta a la esperanza de la curación de las epidemias.

BIBLIOGRAFÍA

BALAGUER PERIGÜELL, E. & BALLESTER AÑÓN, R. (2006), *En el nombre de los niños. Real Expedición Filantrópica de la Vacuna 1803-1806*. Asociación Española de Pediatría: Madrid.

BYRNE, J.P. (2006), *Daily Life during the Black Death*. Greenwood Publishing Group: Westport (Connecticut).

CIPOLLA, C.M. (1977), A Plague Doctor, pp. 65-72. En Harry A. Miskimin, David Herlihy & Abraham L. Udovitch (eds), *The Medieval City*, Yale University Press: Yale.

BOCCACICIO, G. [Mario Blanch, trad.] (1876), *Cuentos de Boccaccio*. Administración de la Biblioteca de la Risa, Librería La Anticuaria: Barcelona.

FERNÁNDEZ TELLEIRO, J. J. (2008), *Robert Koch: el médico de los microbios*. Nivola: Tres Cantos [Madrid].

FRACASTORO, G. [Aníbal Ruiz Moreno, trad.] (1962), *De contagione, et contagiosis morbis et eorum curatione*. Lugduni: apud Guilielmum Gazenium [1550]. [Del contagio, de las enfermedades contagiosas y su curación]. Clásicos de la Medicina: Santiago de Chile.

GONZÁLEZ, N. & RAMOS, C. (2010), Louis Pasteur: el carbunco de las ovejas y el cólera de las gallinas, pp. 112-117. En Emilio Bouza Santiago, Juan J. Picazo de la Garza, José Prieto Prieto (coord.) *Louis Pasteur: una vida singular, una obra excepcional, una biografía apasionante,* Kos. Comunicación Científica y Sociedad: Madrid.

HENRÍQUEZ GARRIDO, R.J. (2017), La analogía de los contagios. Interpretación causal en la medicina renacentista de Fracastoro. Ludus Vitalis 25(48): 61-90.

HESÍODO [Aurelio Pérez Jiménez y Alfonso Martínez Díez, eds.] (1978), *Obras y fragmentos* [estudio preliminar, notas, bibliografía y traducción directa a cargo de Aurelio Pérez Jiménez y Alfonso Martínez Díez]. Gredos: Barcelona.

LAÍN ENTRALGO, P. (1970), *La medicina hipocrática*. Alianza Universidad: Madrid.

LEDERMANN, W. (2003), A propósito del cólera: Max von Pettenkofer y su *Experimentum crucis*. Revista Chilena de Infectología 20(extr.): 84-85.

LÓPEZ PÉREZ, J.A. (1984), Pronóstico y terapia en el tratado hipocrático: Sobre los aires, aguas y lugares, unidad del escrito. Epos: Revista de Filología 1: 103-118.

MAC NEILL, William H. (1976), *Plagues and Peoples*. Anchor Press: New York.

MASSAI, Veronica (2008), *Angelo Gatti (1724-1798): un médico toscano in terra di Francia*. University Press Firenze: Firenza.

METCHNIKOFF, E. (2006), *The Founders of Modern Medicine: Pasteur, Koch, Lister*. Classics of Medicine Library: Delanco, NJ.

PINO CAMPOS, L.M. & HERNÁNDEZ GONZÁLEZ, J. (2008), Los conceptos de peste y epidemia: semántica y lexicografía. Revista de Filología 26: 191-204.

PLATÓN [Marcos Martínez, ed.] (1986), *Diálogos. Vol. 3. Fedón / Banquete; Fedro / Platón* [traducciones, introducciones y notas por Carlos García Gual, Marcos Martínez Hernández, Emilio Lledó Íñigo]. Gredos: Madrid.

RAMOS AGUILAR, C.A. (2015), El prólogo como diagnóstico, antesala de la enfermedad en Edipo Rey. *Tycho* [Valencia] 3: 81-90.

RAMOS GOROSTIZA, J.L. (2014), Edwin Chadwick, el movimiento británico de salud pública y el higienismo español. Revista de Historia Industrial 23(55): 11-38.

RAZZELL, P. (1977), *Edward Jenner's Cowpox Vaccine: The History of a Medical Myth*. Caliban Books: Firle [Sussex].

ROBERTSON, G.L. (1993), *Food Packaging: Principles and Practice*. Basel Marcel Dekker: New York.

SÁEZ GÓMEZ, J.M. (2004), *Pasteur: un benefactor universal*. Nivola: Tres Cantos [Madrid].

TUCÍDIDES [Juan José Torres Esbarkanch, trad.] (1990), *Historia de la guerra del Peloponeso. Libros I-II* [Introducción general de Julio Calonge Ruiz; traducción y notas de Juan José Tores Esbarranch]. Gredos: Madrid.

VANDERMEERSCH, P. (2004), *Carne de la pasión: Flagelantes y disciplinantes. Contexto histórico psicológico*. Trotta: Madrid.

WINSLOW, C-E. & DURAN-REYNALDS, M.L. (1949), Jacme d'Agramont and the first of the plague tractates. Bulletin of the History of Medicine 22: 747-765.

Capítulo II
COVID-19: aspectos diagnósticos, clínicos y terapéuticos

José López Barba[1], Elena Salamanca Rivera[1], Álvaro Pascual Hernández[1, 2] y Jesús Rodríguez Baño[1, 2, 3]

[1] *Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) / Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena / Departamentos de Microbiología y Medicina, Universidad de Sevilla / CSIC*

[2] *Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC)*

[3] *Académico Correspondiente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla*

El presente capítulo ha sido elaborado en base a la evidencia disponible en la fecha de su última revisión (octubre de 2023). Hemos pretendido adaptar, en la medida de lo posible, utilizar términos comprensibles para lectores no especializados o expertos, con un objetivo divulgativo. Se divide en tres secciones, cada una de ellas dedicada respectivamente al diagnóstico, la presentación clínica y el tratamiento de la COVID-19.

1. ASPECTOS DIAGNÓSTICOS

1.1. Introducción

Se denomina COVID-19 a la enfermedad causada por el virus SARS-CoV-2, que pertenece a la familia de los coronavirus, virus muy comunes que afectan principalmente a animales, pero que en ocasiones pueden causar patología en el ser humano. Puede afectar a personas de cualquier edad y cualquiera de ellas puede morir por esta causa. La mayoría de las personas afectadas padecerán una infección respiratoria de leve a moderada.

El diagnóstico microbiológico es esencial para afrontar la pandemia de COVID-19, tanto en su vertiente clínica por los numerosos pacientes afectados y la gravedad en algunos de ellos, como en la epidemiológica, por la alta capacidad de diseminación entre la población con las connotaciones de salud pública derivadas de este hecho.

El diagnóstico microbiológico tiene pues dos objetivos, uno de ellos es detectar y monitorizar al SARS-CoV-2 cuando este produce una infección y el segundo, ser capaz de detectarlo en pacientes sin síntomas, y tomar las medidas necesarias para cortar la cadena de transmisión del virus.

1.2. El virus SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 es un *Betacoronavirus* tipo ARN perteneciente a la familia *Coronaviridae*, que reciben este nombre debido a que las proteínas de su cubierta parecen tener la apariencia de una corona solar al ser observado mediante microscopia electrónica.

Existen cientos de tipos de coronavirus y suelen afectar a especies animales. Para afectar a humanos han de atravesar la barrera de especie a través de un huésped intermedio. Hasta 2019 se conocían siete coronavirus con capacidad de infectar a humanos. Los más frecuentes producían infecciones respiratorias leves (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 y HCoV-OC43) y otros dos habían sido causantes de las epidemias de SARS (SARS-CoV-1) en 2003 y MERS (MERS-CoV) en 2012.

El nuevo virus detectado por vez primera en diciembre del 2019 en Wuhan (China) como agente causante de casos de enfermedad respiratoria grave, fue secuenciado rápidamente e identificado como un coronavirus nuevo. No obstante, resultó ser similar a otros coronavirus ya identificados, siendo denominado como SARS-CoV-2.

El virus, de forma esférica (fig. 1), posee la siguiente estructura:

1. Nucleocápside, que contiene el genoma en forma de ARN, el cual se encuentra muy compactado con proteínas nucleares (proteínas N) y

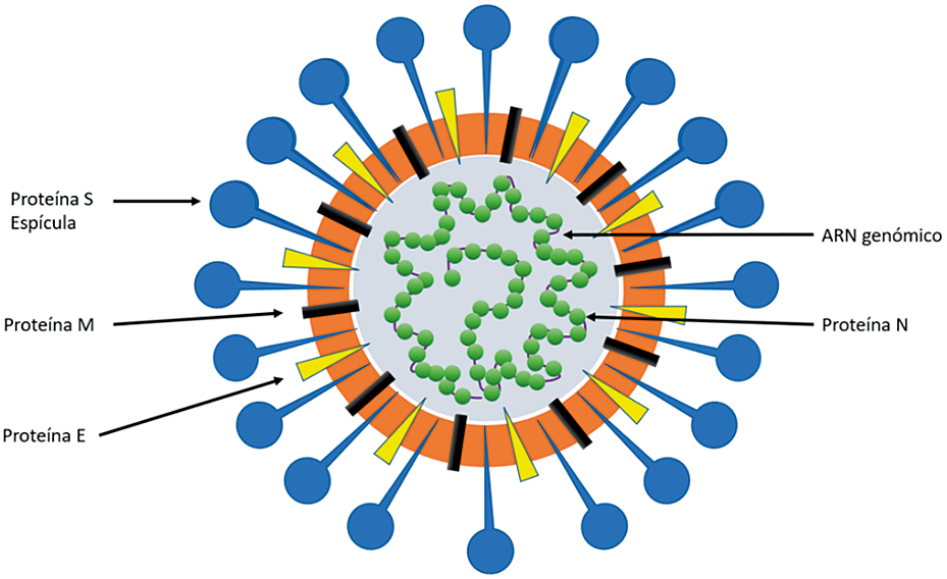


Figura 1. Estructura del virus SARS-CoV-2

2. Envoltura externa, formada por una membrana compuesta por fosfolípidos y proteínas entre las que destacan:
   a. Proteína S: también llamada espícula.
   b. Proteína M o de membrana.
   c. Proteína E o de la envoltura.

El genoma contenido en la nucleocápside codifica proteínas «estructurales» y «no estructurales» necesarias para su ciclo biológico.

Las proteínas estructurales principales son cuatro, las proteínas S, E, M y N:

— Proteína S conocida también como espícula (S), es la proteína más externa y responsable de la unión al receptor celular que permite la entrada del virus a la célula. Se halla compuesta por dos subunidades S1 y S2. La subunidad S1 es la responsable de la unión al receptor celular y la S2 del proceso de fusión entre la envoltura viral y la membrana de la célula que está siendo infectada.
— Proteína E o de la envoltura, importante en el ensamblaje y liberación del virus.
— Proteína M o de la membrana (M), ayuda a mantener la curvatura de la membrana y la unión con la nucleocápside.
— Nucleoproteína (N), es una proteína unida al genoma viral que se expresa abundantemente durante la infección y es fundamental para el proceso de replicación del virus dentro de la célula infectada.

Una vez el virus entra en contacto con las células humanas susceptibles de ser infectadas, normalmente de mucosas, se une al receptor ACE-2 de la célula huésped mediante la espícula o proteína S. A continuación, el virus penetra en el interior de la célula y libera el ARN viral al citoplasma. Este material genético viral ya en el interior de la célula activa y utiliza mecanismos de la propia célula huésped para producir y ensamblar miles de virus nuevos que serán liberados de la célula infectada (Zhu 2020).

El organismo de la persona infectada reacciona ante la infección a través de su sistema inmunitario. Una de las reacciones más importantes es la creación de «anticuerpos», elementos que bloquean principalmente las espículas del virus evitando que infecten nuevas células.

1.3. Técnicas diagnósticas microbiológicas

El diagnóstico microbiológico se basa en la detección del virus en las muestras biológicas de los pacientes. Las principales técnicas para ello son la detección del material genético del virus (ARN) mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN), la detección del propio virus (antígeno), o de los anticuerpos producidos por el sistema inmunológico de la persona infectada.

Las pruebas utilizadas para la detección de una infección activa (PDIA) son la técnica de detección de genoma mediante TAAN tipo PCR o similar y la detección de antígenos. La detección de anticuerpos no se considera en ningún caso para la detección de PDIA (Ministerio de Sanidad Gobierno de España [MSGE] 2021a).

Es importante conocer en cada caso qué muestra biológica es la adecuada para realizar la prueba diagnóstica, cómo se ha de extraer, conservar y transportar antes de ser procesada en el laboratorio, puesto que influye en la calidad de los resultados obtenidos.

Técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

La detección del genoma del virus es la prueba más específica, ya que todo ser vivo está definido por su material genético, el cual, es único y le da su razón de ser, de manera que su detección es una prueba inequívoca de la existencia del virus en el paciente.

Estas técnicas son consideradas técnicas de referencia en el diagnóstico de la COVID-19. Son técnicas muy sensibles y específicas y se encuentran avaladas por las organizaciones reguladoras internacionales.

Debido a la rápida disponibilidad de la secuencia del genoma viral se dispone actualmente de TAAN que permiten detectar partes muy concretas del virus denominadas «dianas». En general estas dianas específicas de SARS-CoV-2 se encuentran incluidas en regiones codificantes de proteínas estructurales y no estructurales.

Para la realización de las TAAN las muestras más adecuadas son las del aparato respiratorio; de ellas las más usadas y recomendadas internacionalmente son el exudado o frotis nasofaríngeo (FNF) y el orofaríngeo (FOF) o ambas combinadas. No obstante, puede detectarse el genoma viral en otros tipos de muestra como aspirado o lavado nasal, saliva, lagrimas, exudado/frotis nasal bilateral, esputo, aspirado traqueal, lavado bronquioalveolar, heces, orina, y sangre completa.

El procedimiento de recogida de las muestras y el mantenimiento de su integridad hasta que se realizan las pruebas microbiológicas, son esenciales para que el rendimiento de estas sea adecuado. En el caso de FNF la muestra se toma mediante hisopos finos y flexibles con extremos flocados de dacrón o poliéster, que son introducidos a través de los orificios nasales hasta alcanzar la nasofaringe, donde tras rotarlos son extraídos e introducidos preferentemente en un medio específico de trasporte de virus.

Las muestras son transportadas refrigeradas en contenedores adecuados hasta el laboratorio donde se procesan. Una vez tomada la muestra puede mantenerse viable al menos 5 días si se mantiene a temperaturas entre 2 y 8 °C, y mucho más tiempo si se conserva a -70 °C.

Las técnicas TAAN son muy específicas, pero no carentes de complejidad, motivo por el cual su procesamiento ha de ser cuidadoso. Es clave la manipulación en cabinas de flujo laminar, procedimientos exhaustivos de descontaminación y limpieza, así como cumplir las normas de bioseguridad y los procedimientos normalizados de trabajo establecidos en cada caso.

El SARS-CoV-2 es un agente clasificado como de grupo de riesgo 3 por la Organización Mundial de la Salud (WHO 2021). Para el procesamiento de muestras clínicas se necesita al menos un «nivel 2» de bioseguridad en el laboratorio, nivel que poseen la mayoría de los laboratorios asistenciales.

En general, las TAAN detectan dianas específicas de SARS-CoV-2 incluidas en regiones codificantes de dos tipos de proteínas, estructurales y no estructurales:

— Proteínas estructurales del virus: espícula (S), envuelta (E) y nucleocápside (N).
— Proteínas no estructurales: gen RdRP (RNAdependent RNA polymerase), gen región ORF1ab (Open Reading Frame 1ab) y gen región ORF8. (Open Reading Frame B).

Igualmente se puede hablar de varios tipos de TAAN según la plataforma y sistemática utilizada.

— Sistemas que realizan técnicas TAAN en muestras individualizadas en un único dispositivo, utilizados como técnica de diagnóstico rápido.
— Sistemas en los que se pueden trabajar hasta 96 o más muestras a la vez, unificando todo el proceso en el mismo equipo o separando las distintas fases en diferentes equipos, utilizado para el procesamiento de elevado número de muestras.
— Técnicas «multiplex», de distintos formatos, que permiten detectar SARS-CoV-2 junto a otros virus respiratorios, habitualmente Virus de la Gripe y Virus Respiratorio Sincitial.
— Técnicas para detectar deleciones y mutaciones puntuales de interés para la detección de variantes altamente preocupantes del virus.

De la misma forma, según la metodología existen diferentes TAAN, las más conocidas son:

— Mediante Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Realiza la detección directa de material genómico por amplificación de ácidos nucleicos; es una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con transcriptasa inversa. Es la técnica más usada y disponible comercialmente. En el caso de que la prueba incluya la cuantificación en tiempo real hablamos de qRT-PCR. Los genes diana más usados son el gen E, N, S, RdRP y ORF.
— Mediante amplificación isotérmica, incluyendo:
  - TAAN isotérmicas que realizan una amplificación mediada por transcripción; son las denominadas TMA (*transcription mediated amplification*) que detectan directamente ARN, utilizando una transcriptasa inversa retroviral. Incluyendo:
    √ Técnica «*Nicking endonuclease amplification reaction* (NEAR)».
    √ Técnica mediada por bucle (RT-LAMP; *reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification*) (Alekseenko 2021; Anastasiou 2021), que mejora la sensibilidad utilizando

de cuatro a seis secuencias diana diferentes, mientras que las PCR convencionales usan de 2 a 3 dianas.

√ Técnica «*Helicase-dependent amplification* (HDA)».

√ Técnica «*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)» (MSGE 2020), donde enzimas presentes en células eucariotas denominados «Cas» cortan secuencias concretas del genoma viral. La técnica se basa en las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (Ackerman 2020; Zhu 2021).

√ Técnica «*Strand displacement amplification* (SDA)». Amplificación por desplazamiento de cadena.

La RT-PCR (la más utilizada) presenta una sensibilidad de 85-90 % y una especificidad del 99,5 %. La sensibilidad se ve afectada por la calidad de la muestra y el momento de la infección en la que ésta se recoge. Aunque presenta la especificidad más alta de las técnicas diagnósticas, la RT-PCR no llega a diferenciar con precisión entre una infección aguda y una infección pasada y ya resuelta (fig. 2).

En el procesamiento se extrae el ARN de la muestra, se procede a la transcripción inversa para transformarlo en ADN mediante una enzima específica; a continuación, se añaden pequeños fragmentos de ADN que serían complementarios del ADN viral transcrito. Algunos de estos fragmentos servirán para la multiplicación posterior de este fragmento de ADN y otros servirán como marcadores que permitirán su detección. En el siguiente paso esta combinación se introduce en un aparato de RT-PCR donde la mezcla se somete a una serie de ciclos de calor-frio, lo cual provoca una serie de reacciones que llevan al final a la amplificación del fragmento específico del virus, el cual, aumenta en número, duplicándose en cada ciclo calor-frio. Se obtienen millones de copias del fragmento vírico que se busca si este estuviese presente. Las copias que se van creando en cada ciclo van también adquiriendo el marcador que se había añadido a la mezcla para ser detectado, de forma que emite fluorescencia. Esta fluorescencia es detectada de forma continua por el equipo o aparato donde se está realizando la PCR y va siendo reflejada en el programa informático de soporte del mismo, ciclo a ciclo. Cuando el programa informático considera que la magnitud de la fluorescencia supera un nivel determinado procede a confirmar la presencia del virus.

El número de ciclos que tarda la PCR en alcanzar ese nivel es lo que se conoce como ciclo de umbral de positividad (*cycle threshold,* CT). Este valor no es absoluto y no existen estándares de cuantificación, ya que depende de factores asociados a la calidad de la muestra y momento de la toma de la muestra.

El tiempo de realización de las técnicas varían desde 20 a 40 minutos en las técnicas de detección rápida utilizadas para muestras individuales, hasta 3 a 4 horas en las realizadas en plataformas para un número elevado de muestras.

Las técnicas TAAN se utilizan para detectar el virus en pacientes sintomáticos, pero también en pacientes asintomáticos. La detección mediante esta técnica es indicativa de la existencia del virus en el organismo. Las principales indicaciones de estas técnicas son:

— Diagnóstico de infección aguda en pacientes con alta sospecha por el cuadro clínico que presenta.

— Diagnóstico de infección ante la sospecha de exposición reciente a personas ya diagnosticadas de infección por SARS-CoV-2.

— Para determinar la resolución de la enfermedad en pacientes inmunodeprimidos o graves (Avanzato 2020).

— En el contexto de estudio de brotes en la comunidad o intrahospitalarios.

— Para despistaje de contactos estrechos.

— Para cribado poblacional de personas asintomáticas o en estados preclínicos sin que se tenga conocimiento de contacto o exposición previa. El cribado poblacional permite encontrar personas con el virus, asintomáticas en ese momento, y tomar medidas que corten la transmisión.

El momento de la toma de muestras para la realización de este tipo de técnicas influye en la posibilidad de detectar el virus y por lo tanto en la interpretación de esta técnica.

La carga vírica es muy alta en las fases iniciales y va disminuyendo a medida que pasan los días, lo cual hace a la PCR una técnica de elección para el diagnóstico microbiológico en todas las fases de la enfermedad, debido a su capacidad de detección de cantidades de carga vírica muy pequeñas.

El virus puede detectarse a partir del tercer día tras el contagio (antes de que aparezcan incluso los síntomas), hasta inclusive un mes después del inicio de la sintomatología (Bohn 2020; Marks 2021). A veces, se puede detectar mucho más tiempo (varios meses) sobre todo en pacientes graves e inmunodeprimidos (Avanzato 2020).

A pesar de que es la técnica de referencia, la interpretación ha de ser realizada por personal especializado, ya que pueden existir (aunque sea en una pequeña proporción), como en toda técnica de laboratorio, tanto falsos positivos como falsos negativos en los resultados obtenidos. Los falsos positivos son muy infrecuentes y principalmente producidos por contaminaciones cruzadas

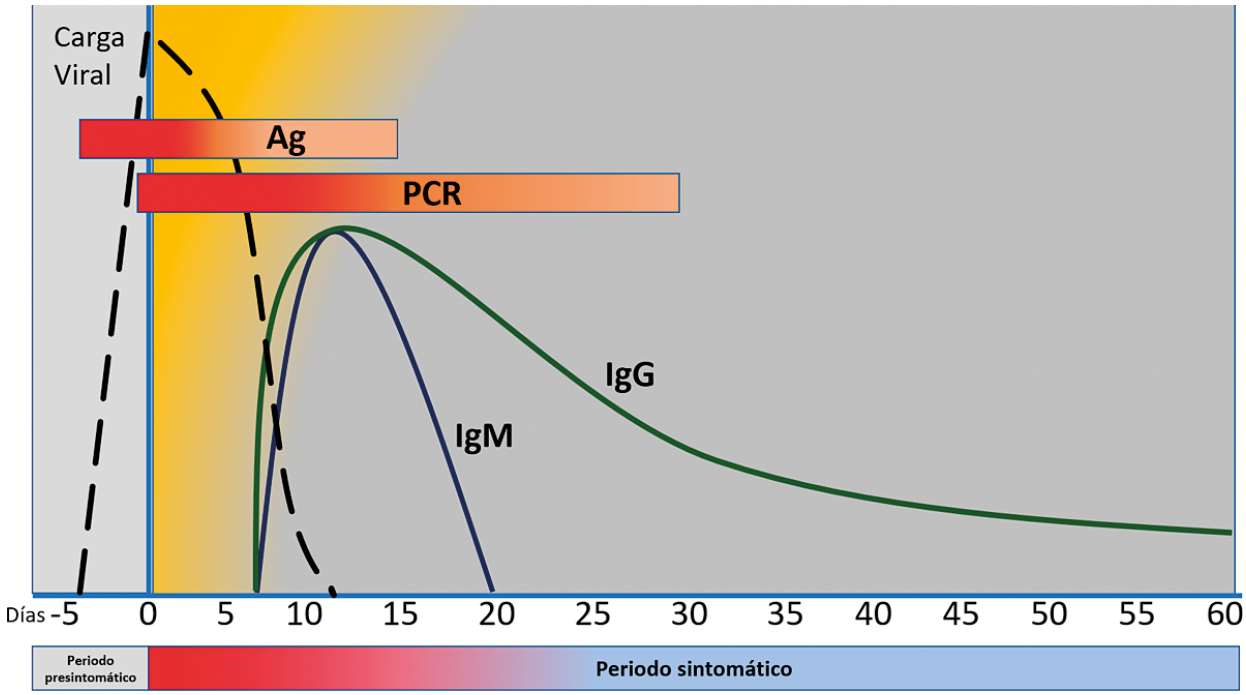


Figura 2. Evolución durante la enfermedad de la capacidad de detección de las pruebas diagnósticas microbiológicas frente a SARS-CoV-2 (Ag: antígeno; PCR: reacción en cadena de la polimerasa)

entre muestras o error de etiquetaje. Los falsos negativos (5-20 %) se producen por muestra insuficiente, poca carga vírica, trasporte inadecuado o error de etiquetaje. La prueba PCR SARS-CoV-2 ofrece resultados solo de tipo cualitativo, no están autorizadas para ser emitidas de forma cuantitativa. Los resultados posibles son

— Positivo: se confirma la existencia de material genético de SARS-CoV-2 en la muestra estudiada. Un resultado «Positivo» no es indicativo de que exista replicación y de que estemos ante situaciones de infección activa o contagiosidad del paciente, ya que la PCR detecta material genético del virus, pero este puede estar ya inactivo.
— Negativo: no se confirma la existencia de material genético de SARS-CoV-2 en la muestra estudiada. Un resultado «Negativo» no excluye la existencia de la infección, por lo que ante una alta sospecha sería preciso repetir la prueba. En casos de pacientes graves se recomienda realizarla en muestras del tracto respiratorio inferior.
— No concluyente; el resultado no puede ser considerado ni positivo ni negativo y se requiere de una nueva muestra para el estudio de la prueba. Los resultados no concluyentes han de ser interpretados de forma cuidadosa, ya que en ocasiones (muy poco frecuentes) pueden detectarse falsas señales fluorométricas con valores CT altos. Esta circunstancia puede ocurrir en fases muy precoces de la infección con alta replicación viral, pero con poca carga y en las fases de resolución de la enfermedad (Mina 2020). En estos casos se repite la prueba en la misma muestra por otro aparato o se solicita una nueva muestra para estudio.

Los resultados obtenidos no son siempre homogéneos, dependen de la calidad de la muestra, de la cantidad de virus en esa parte del cuerpo en el momento de la toma de la muestra, de las dianas utilizadas en la PCR e incluso del equipo o tecnología utilizada. El valor de CT obtenido en la PCR es un parámetro solo aproximativo al valor de la carga viral y sujeto a múltiples variables (Dahdouh 2021).

Establecer correlaciones del valor del CT con la contagiosidad, viabilidad del virus, fase de la enfermedad o su pronóstico es muy controvertido. No obstante, en las fases iniciales con carga vírica alta (entre 10^5 y 10^8 copias de genoma/ por muestra nasofaríngea o de saliva), el tiempo en que la PCR alcanza el umbral de detección o CT es bajo, es decir, parece existir una relación inversa entre la agudeza de la enfermedad y el valor del CT. Altas cargas víricas estarían relacionadas con una mayor contagiosidad, por lo que valores bajos de CT también estarían relacionados con alta contagiosidad (MSGE 2021a). De la misma forma se ha consensuado que valores de CT > 30 podrían corresponder a un virus potencialmente no infectivo, pero también a una muestra positiva donde la carga viral es baja por mala calidad de la toma de la muestra, por lo que en toda interpretación ha de ser contemplada

la evolución clínica, la gravedad, el estado de inmunosupresión del paciente y la situación epidemiológica.

Los valores de carga vírica comienzan a disminuir a partir del día 5 de la enfermedad, hasta prácticamente desaparecer el día 10. Estos valores decrecientes de carga vírica se producen paralelamente al incremento gradual del CT. La detección de CT muy elevados más allá del día 10, suele corresponder a virus no infectivos con cargas virales por debajo de 10^5 copias RNA por torunda (sin crecimiento demostrado en cultivos celulares).

Finalmente hay que considerar que existen otras TAAN SARS-CoV-2 distintas a la RT-PCR que no ofrecen el valor CT y por tanto la comparación entre técnicas es también variable.

Técnicas de detección de antígenos

Este tipo de técnica se basa en la detección directa de proteínas virales específicas del virus SARS-CoV-2. Las muestras biológicas utilizadas son el FNF, FOF y esputo, si bien la más empleada es el FNF. La muestra una vez tomada ha de ser puesta en contacto con un reactivo denominado «buffer» antes de proceder a la realización del test; es lo que se denomina pretratamiento de la muestra. Este buffer libera la proteína N viral y queda expuesta de manera que podrá reaccionar con los anticuerpos de los inmunoensayos. Los test utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, o policlonales de conejo u otras especies para capturar al antígeno viral. Presenta una sensibilidad superior al 95 % (en pacientes sintomáticos) y una especificidad del 95 al 99 %. Al igual que las TAAN la sensibilidad se ve afectada por la calidad de la toma de la muestra y el momento de la infección en la que esta se recoge, siendo más rentable su uso en los períodos iniciales de la infección (fig. 2).

En la actualidad se dispone de dos tipos de técnicas de detección de antígeno de SARS-CoV-2, ambas basadas en la detección de proteína N viral:

— Inmunocromatografía o inmunoensayos de flujo lateral (IEFL). Se presentan en pequeños kits que contienen todo el material necesario para hacer las determinaciones individualmente. Son conocidos como «test rápidos». Los kits comercializados pueden ser específicos frente a SARS-CoV-2 o combinado; con la detección simultanea el antígeno del virus de la gripe y/o del antígeno del virus sincitial respiratorio.
— Técnicas de quimioluminiscencia (CLIA) o enzimoinmunoensayo (EIA), Precisan de equipos más complejos, algunos de ellos automatizados, con capacidad de realizar más de 100 pruebas por hora.

En el caso de IEFL para la detección de antígenos se utilizan pequeños dispositivos o casetes donde el reactivo que contiene cambia de color al contacto con el material antigénico e indica que el virus está presente en la muestra estudiada. Disponen de un control interno, normalmente una proteína de origen animal. Para que se produzca el cambio de color es preciso que exista una alta concentración de virus en la muestra. Este tipo de test ofrece resultados en 10 a 30 minutos y por ello son considerados como test rápidos. El resultado es cualitativo, positivo o negativo, siempre que el control interno sea el adecuado, si no la técnica no es válida.

Las técnicas CLIA o EIA para detección de antígenos son habitualmente realizadas en equipos automatizados, los cuales detectan una señal lumínica que es proporcional a la cantidad de proteína N viral presente en la muestra. Esta técnica incluye además de control interno, calibradores, ya que el resultado obtenido se obtiene en valores cuantitativos. No obstante, el resultado informado es cualitativo (positivo o negativo), ya que aún no está estandarizada esta cuantificación y a que existen equipos que emiten los resultados de forma cualitativa. El tiempo de obtención de los resultados es superior al de IEFL, con tiempos de respuesta entre 30 y 160 minutos.

El test antigénico está indicado en los siguientes casos:

— Pacientes sintomáticos con sospecha clínica de infección por SARS-CoV-2 en los primeros 5 días desde el inicio de los síntomas (Alekseenko 2021; European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] 2020a).
— Estudio y control de brotes en instituciones, preferiblemente tras la confirmación de los casos iniciales mediante RT-PCR (WHO 2020a).
— Diagnóstico de casos sospechosos en centros sociosanitarios, penitenciarios y otras instituciones cerradas, si no se puede disponer de resultados de RT-PCR en menos de 24 h (MSGE 2021a).
— Contactos estrechos asintomáticos de casos confirmados (Centers for Disease Control and Prevention [CDC] 2021a; ECDC 2020a; MSGE 2021a; WHO 2020a).
— Cribados poblacionales.
— Detección de infectados asintomáticos.
— Como auto test, pueden ser empleados por la población general para el conocimiento de una posible infección. No están indicados en pacientes sintomáticos o contactos de casos confirmados, ni se admite como preadmisión para asistir a un evento ni tras volver de un área de riesgo. No obstante, si están indicados en el caso de personas asintomáticas que buscan una mayor seguridad antes de acudir al centro de trabajo o reuniones (Cilla 2021).

Un resultado negativo no descarta la infección, por lo que si existe una sospecha clínica se deberá realizar una PCR. Si ésta es positiva, confirmará el diagnóstico.

Técnicas de detección de anticuerpos

El sistema inmunitario ante el ataque de agentes externos como los virus, reacciona produciendo inmunoglobulinas (Ig) que le ayudan a defenderse de la agresión. Estas inmunoglobulinas, denominadas anticuerpos, no solo pueden combatir la infección, sino que pueden permanecer en el cuerpo humano más tiempo tras la cura de la enfermedad, sirviendo de medida defensiva ante una posible nueva infección. Estos anticuerpos son específicos frente a cada agente, pero su producción puede también ser inducida mediante el uso de vacunas. Las vacunas específicas de SARS-CoV-2 producen en el cuerpo un efecto inmunógeno de creación de anticuerpos específicos frente a SARS-CoV-2. Así pues, la detección de anticuerpos en una persona antes de la vacunación es evidencia certera de que se ha producido contacto del paciente con el virus. No obstante, una vez vacunada frente al SARS-CoV-2 puede indicar tanto contacto con el virus como estado de vacunación y habrá de ser valorada la historia clínica en cada caso. Estas técnicas detectan los anticuerpos producidos por el paciente en sangre o suero y por ello son denominadas también como pruebas serológicas.

El cuerpo humano produce 5 tipos de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), Estos anticuerpos no aparecen inmediatamente, sino que lo hacen tras 5 a 7 días tras la infección (fig. 2). Su orden de aparición difiere del patrón habitual en otras enfermedades infecciosas. Normalmente aparece primero la IgM y posteriormente la IgG; en el caso del del SARS-CoV-2 no siempre es así, pudiendo aparecer al mismo tiempo ambas IgG e IgM, o incluso la IgG en primer lugar (Long 2020; To 2020).

Ambos anticuerpos son detectables a lo largo del primer mes (Long 2020; Wölfel 2020) tras el debut del cuadro clínico, aunque la IgM puede llegar a detectarse hasta la semana 8 tras la aparición de los síntomas y la IgG hasta seis meses después. Un elevado número de personas que pasan la infección mantienen niveles de IgG detectables que podrían ofrecer protección frente a la reinfección (Dan 2021). En las pruebas serológicas los anticuerpos del SARS-CoV-2 más frecuentemente buscados son IgG, IgA e IgM. Existe la capacidad de detectar cada uno de ellos de forma individual, pero también conjuntamente, es lo que se denomina «anticuerpos totales».

Las muestras biológicas utilizadas son sangre total, suero o plasma y dependerá la elección de la misma del tipo de técnica utilizada. La sensibilidad de la prueba depende del momento en la evolución de la infección donde se tome la muestra y se realice el test, variando entre un 50 % en los días 1 a 5 hasta un 90 % tras 20 días desde el inicio. La especificidad es superior al 98 % (Zheng y Song 2021).

Para la realización de las técnicas serológicas existen dos sistemáticas al igual que en el caso de las técnicas para detección de antígenos. Los test basados en inmunoensayos de flujo lateral (IEFL) y los realizados en plataformas automatizadas, ya sean enzimoinmunoensayo (EIA) o inmunoensayos de quimioluminiscencia (CLIA). Los IEFL para la detección de anticuerpos son fáciles de realizar, se toma una gota de sangre por punción del dedo y se deposita en una tira reactiva. Si aparece cambio de color es indicativa de presencia de anticuerpos, ofreciendo resultados rápidamente entre 15 a 30 minutos (Sheridan 2020).

En estos momentos, internacionalmente se recomienda (CDC 2022; WHO 2020b) la realización de los test serológicos SARS-CoV-2 en suero o plasma en plataformas automatizadas en laboratorios con experiencia en la realización de test serológicos, mediante técnicas de EIA y CLIA. Las indicaciones principales de este tipo de técnicas son:

— Estudios de seroprevalencia.
— Criterio diagnóstico de infección pasada.
— Síndrome inflamatorio multisistémico pediátrico (CDC 2020).
— Pacientes con clínica e imagen compatible y TAAN y/o antígenos negativos (CDC 2022; Cheng *et al.* 2020).

Los test serológicos no se recomiendan para:

— El diagnóstico de la infección aguda (CDC 2022; WHO 2020b).
— Evaluar la inmunidad al SARS-CoV-2 después de la vacunación contra el COVID-19.
— Evaluar la necesidad de vacunación en una persona no vacunada.
— Para determinar la necesidad de cuarentena después de un contacto cercano con alguien que tiene COVID-19.

Aunque los equipos automatizados pueden ofrecer resultados cuantitativos o semicuantitativos, los resultados informados son de tipo cualitativo, «Positivo/Negativo».

La cuantificación varía entre distintos reactivos y equipos, y no esta estandarizada, motivo por el cual, los valores cuantitativos no son válidos para establecer criterios de nivel de protección frente a la enfermedad, ni para valorar cuándo vacunar o no a una persona. El valor cuantitativo o semicuantitativo en un mismo equipo de los anticuerpos IgG, sí es útil para valorar una seroconversión, considerando como tal el incremento del valor detectado de anticuerpos en 4 veces en una segunda muestra, en comparación con una inicial, permitiendo el diagnóstico de infección reciente.

Antes de la utilización de la vacuna, una serología positiva era indicativa de contacto con el virus, y si el paciente tenía clínica compatible, de posible infección. Hoy en día la existencia de anticuerpos frente a SARS-CoV-2 ha de ser valorado teniendo en cuenta el estado vacunal del paciente, ya que también en este caso los anticuerpos son detectados.

La posibilidad de detectar anticuerpos dirigidos frente a diferentes dianas antigénicas del virus ha permitido diferenciar entre la situación de contacto y vacunación. Así los anticuerpos que tienen como diana antigénica la proteína N viral, indican que son anticuerpos producidos por contacto con el virus, ya que no se producen tras la inoculación de la vacuna; mientras que los anticuerpos dirigidos a la proteína S aparecerían en ambas circunstancias.

Cultivo celular

Es la técnica que mejor refleja la viabilidad del virus. Precisa de laboratorios de bioseguridad de nivel 3, personal especializado y con experiencia. La técnica trata de cultivar el virus, para ello, tras realizar un proceso de pretratamiento de la muestra, se cultivan en líneas celulares que sean susceptibles a la infección por SARS-CoV-2. Las líneas celulares más utilizadas con este fin son las líneas celulares «Vero».

El cultivo celular está indicado en los siguientes casos:

— Detección de SARS-CoV-2 viables en muestras biológicas.
— Para considerar que un paciente infectado ha dejado de ser contagioso, ya que la RT-PCR puede permanecer positiva en pacientes con virus no viables y por tanto no contagiosos (Wölfel 2020).
— Viabilidad de las distintas variantes SARS-CoV-2 que van apareciendo.
— Realización de pruebas de sensibilidad *in vitro* frente a fármacos con actividad frente a SARS-CoV-2.

1.4. Técnicas para el estudio de variantes SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 presenta un ciclo biológico donde es constante la aparición de mutaciones en su ciclo replicativo, dando lugar a nuevas variantes. Por ello, la aparición de mutaciones es algo esperable en este tipo de virus.

Desde su aparición en 2019 han emergido numerosas variantes de SARS-CoV-2, cada una de ellas tiene una o más mutaciones que la diferencia de las demás. No todas las variantes tienen la misma repercusión, muchas de ellas no hacen al virus más contagioso o más patógeno, sin embargo, en otras ocasiones algunas mutaciones o combinaciones de mutaciones pueden proporcionar al virus una ventaja selectiva como, por ejemplo, una mayor transmisibilidad, menor vulnerabilidad frente a los anticuerpos posinfección o posvacunales, menor capacidad de ser detectado mediante pruebas diagnósticas o menor susceptibilidad a los tratamientos (MSGE 2021b).

Estas situaciones han llevado a la comunidad científica a categorizar a las nuevas variantes en base a dichas circunstancias surgidas tras la mutación o mutaciones (ECDC 2022; CDC 2021b; WHO 2023).

Internacionalmente se agrupan las variantes en 4 grupos, que de menor a mayor relevancia son:

— VUM: «*variants under monitoring*» (variantes bajo control).
  - Linajes con un posible impacto en las medidas médicas disponibles para contrarrestarlos con base en el análisis de los datos de secuencias genéticas.
  - Linajes que solían causar formas más graves de la enfermedad o aumentar la transmisión pero que ya no se detectan.
  - Linaje con una cantidad inusualmente grande de mutaciones antigénicas.
  - Linajes que habían sido designados como VOI, VOC o VOHC actualmente en circulación a muy bajos nivel.
— VOI: «*variants of interest*» (variantes de interés).
  - Variante con cambios genéticos que se prevé o se sabe que afecta a las características del virus como transmisibilidad, virulencia, pérdida de anticuerpos, detectabilidad, susceptibilidad a acciones terapéuticas y
  - Se ha identificado que tiene una ventaja de crecimiento en más de una región de la OMS con una prevalencia relativa creciente junto con un número creciente de casos en el tiempo u otros impactos epidemiológicos aparentes que sugieran un riesgo emergente para la salud pública mundial.
— VOC: «*variants of concern*» (variantes preocupantes).
  - Una variante VOI es reevaluada como VOC cuando cumple además al menos uno de los siguientes criterios comparada con otras variantes:
    √ Cambio perjudicial en la gravedad clínica de la enfermedad.
    √ Cambio en la epidemiología de COVID-19 que cause un impacto sustancial en la capacidad de la atención a los pacientes con COVID-19 u otras enfermedades y que, por lo tanto, que requieran intervenciones importantes de salud pública.
    √ Disminución significativa de la eficacia de las vacunas disponibles en la protección contra la enfermedad grave.

— VOHC: «*variants of high consequences*» (variantes de graves consecuencias).
  - Fallo demostrado en la detección mediante las de pruebas de diagnóstico.
  - Evidencia que sugiere una reducción significativa en la eficacia de las vacunas, demostrada por una cantidad desproporcionadamente alta de casos de infección en vacunados, o muy baja protección inducida por las vacunas.
  - Reducción significativa en la susceptibilidad a múltiples tratamientos.
  - Casos más graves de enfermedad clínica y aumento de las hospitalizaciones.

Las variantes VOC y VOHC poseen características especiales que las hacen más preocupantes, y son vigiladas de forma más exhaustiva. Actualmente un ejemplo de VOC son ciertas variantes Ómicron (linajes Linajes B.1.1.529 y descendientes) (ECDC 2023).

Tal es la importancia de estas variantes y sus consecuencias en la salud pública, que el MSGE siguiendo recomendaciones del ECDC ha integrado la secuenciación genómica en la vigilancia del SARS-CoV-2 (MSGE 2021b). Para ello ha sido preciso la implementación de técnicas que permiten detectar la aparición de las nuevas variantes, estudiar sus características y monitorizar las tendencias a nivel nacional e internacional de las mismas, sobre todo en el caso de las variantes VOC y VOHC.

En España existe una red de Laboratorios de referencia de Microbiología coordinados desde el MSGE que realizan una vigilancia de las variantes mediante secuenciación del genoma completo del virus, permitiendo prácticamente en tiempo real tener datos de las variantes circulantes, la aparición de nuevas variantes y su diseminación. Estas acciones permiten realizar acciones importantes en salud pública. No obstante, debido a la cantidad de muestras positivas es preciso hacer un cribado de muestras antes de realizar la secuenciación genómica.

El cribado se realiza sobre muestras positivas por TAAN a SARS-CoV-2 (al menos el 5 % de todos los positivos en período de alta incidencia), a las cuales se les realiza una RT-PCR de mutaciones concretas, que permiten sospechar la presencia de estas variantes.

El cribado deberá tener la capacidad de detectar al menos las variantes VOC (Matic 2021). Posteriormente se realiza la confirmación mediante técnica de secuenciación parcial o completa del genoma:

— Técnica de secuenciación parcial. Consiste en la secuenciación parcial o completa del gen que codifica la proteína de la espícula (gen S); es el gen más sometido a presión selectiva y donde se han descrito más mutaciones. La tecnología utilizada es tipo Sanger-Coulson, o de terminación de la cadena; se basa en la síntesis secuencial de una hebra de ADN complementaria a la hebra de cadena simple cuya secuencia quiere determinarse. Posteriormente se obtienen 4 fragmentos que, al ser separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, permiten determinar la secuencia de nucleótidos de la cadena de ADN molde gracias al marcaje incorporado en el cebador (Carla 2021).
— Técnica de secuenciación completa. Técnica más compleja que la anterior, requiere de laboratorios y personal experimentado. Hay varios métodos para la secuenciación completa basados en el concepto «NGS» (*next generation sequencing*). Los protocolos más utilizados son los metagenómicos (mNGS) cuando el ADN ha sido extraído directamente de la muestra clínica en ausencia de un cultivo previo, y los protocolos de enriquecimiento.

Los principales parámetros relacionados con la técnica que son de importancia para las diversas aplicaciones incluyen, el enfoque elegido en la construcción de librerías genómicas de secuenciación, la longitud de lectura, la tasa de error y el tipo de secuenciador (ECDC 2020b).

Es preciso poner de manifiesto la importancia de compartir los datos obtenidos a nivel internacional de los estudios de secuenciación, ya que es una herramienta básica para el control del SARS-CoV-2 y de la evolución de la pandemia. Un excelente ejemplo es la base de datos internacional contenida en GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*) (https://www.gisaid.org/hcov19-variants//).

En 2023 estas técnicas de secuenciación han pasado a ser parte fundamental de la estrategia de vigilancia y control del SARS-CoV-2 del MSGE, al haber sido integradas en el sistema de vigilancia de infecciones respiratorias agudas en Atención Primaria (IRAs) y en hospitales (IRAG) conocido como SiVIRA (MSGE 2023a, MSGE 2023b). Su objetivo es la vigilancia del SARS-CoV-2, del virus de la Gripe y del Virus Respiratorio Sincitial, así como de cualquier otro virus que pueda ser de interés o emerger en un futuro.

2. ASPECTOS CLÍNICOS

2.1. Generalidades

El período de incubación medio de la enfermedad es de aproximadamente 5 días (Li 2021; Wiersinga 2020) siendo lo más frecuente que la aparición de los síntomas sea entre los días 3 y 7 desde la exposición (Ludwig 2020). El tiempo medio desde la aparición de los primeros síntomas hasta la hospitalización es de 5,5 días

(IC95 %: 4,6-6,4) (Li 2021) y la duración de los síntomas es de 11,5 días de media (Wiersinga 2020; Pascarella 2020).

La enfermedad puede presentarse desde una forma asintomática hasta un fracaso multiorgánico (Pascarella 2020). Los síntomas más frecuentes de la enfermedad son fiebre, tos seca y dificultad respiratoria (Wiersinga 2020; Ludwig 2020) aunque se han descrito otros síntomas menos frecuentes como astenia, náuseas y vómitos, mialgias, ageusia y anosmia, cefalea o conjuntivitis.

Las complicaciones de la COVID-19 pueden ser muy variadas, pero las más frecuentes son consecuencia del estado protrombótico con formación de agregados plaquetarios en los diversos territorios, causando fenómenos isquémicos y deterioro en la función renal, hepática o cardíaca.

2.2. Fisiopatogenia

Como se ha comentado en la parte 1 del presente capítulo, la unión del SARS-CoV-2 a la proteína transmembrana enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), que actúa como su receptor, es el principal mecanismo mediante el cual el virus invade y daña sus células diana. Este receptor está presente en varios órganos y tejidos siendo especialmente predominante en el epitelio pulmonar y el endotelio vascular. De ello se deduce la aparición de endotelitis y edema pulmonar, así como la aparición de trombosis vasculares múltiples y la neovascularización.

También como consecuencia de este daño endotelial se produce la invasión perivascular del tejido pulmonar por linfocitos y la linfopenia circulante. La exposición al daño endotelial activa la agregación plaquetaria e induciría la hiperproducción de mediadores inflamatorios (citoquinas), resultando en la famosa «tormenta de citoquinas» (Menezes 2021), aunque la magnitud de la misma es menor que en otras enfermedades inmuno-mediadas.

2.3. Características demográficas

La COVID-19 puede afectar a cualquier persona, independientemente de edad y género u otras características, si bien, en general, son anecdóticos los casos graves descritos en edad pediátrica. Se ha descrito cierta susceptibilidad genética que se relacionaría con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad grave (Ellinghaus 2020). Hay estudios en curso que tratan de buscar también características genéticas relacionadas con mejor pronóstico o incluso protectoras para la infección.

En los primeros reportes al inicio de la pandemia con datos de historia natural de las primeras variantes, y antes de la llegada de las vacunas, se describe que la edad media entre los fallecidos era 20 años mayor (68,9 años, IC 95 %: 66,8-71,9) que en los supervivientes (50,7 años, IC 95 %: 46,6-54,8, p<0,0001), sin diferencia de sexo. En general, aunque sin alcanzar en todos los casos la significación estadística, antecedentes como hipertensión, diabetes, malignidad y enfermedad cardíaca, renal o pulmonar, estaban con más frecuencia presentes en el grupo de fallecidos. Sin embargo, no se ha demostrado ninguna diferencia entre supervivientes o fallecidos en términos de sintomatología predominante en la presentación clínica.

2.4. Presentación respiratoria

Según un metaanálisis publicado recientemente en el que se incluyeron 212 estudios (281.461 pacientes) (Li 2021), el síntoma más frecuente fue la fiebre (78,8 %, IC 95 %: 76,2-81,3), seguido de la tos (53,9 %, IC 95 %: 50-57,7) y malestar general (37,9 %: IC 95 %: 29,5-47,1). A diferencia de otras infecciones virales respiratorias, la proporción de pacientes con rinorrea fue baja (menos de un 10 % de los casos). Un 22,9 % de los pacientes cumplían criterios de enfermedad grave según la definición de la OMS/IDSA (Metlay 2019; WHO 2020). La proporción de pacientes que precisó ingreso en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) fue del 10,96 % (IC95 %: 6,6-17,6), requiriendo ventilación mecánica un 7,1 %.

La Organización Mundial de la Salud (WHO 2020) en un esfuerzo por hacer una orientación al manejo clínico de la COVID-19, publica en mayo de 2020 un documento en el que además categoriza la enfermedad en función de la gravedad de presentación en:

- **Enfermedad Leve:** paciente sintomático, caso COVID-19 confirmado, pero no presenta neumonía ni hipoxia.
- **Enfermedad Moderada (Neumonía):** paciente con signos de neumonía (fiebre, tos, disnea, taquipnea) pero sin signos de neumonía grave, en particular SatO2 ≥90 % con aire ambiente.
- **Enfermedad Grave (Neumonía Grave):** signos clínicos de neumonía más alguno de los siguientes: frecuencia respiratoria >30 inspiraciones/minuto, dificultad respiratoria grave o SatO2 <90 % con aire ambiente. Aunque el diagnóstico se puede establecer por la clínica, la radiología torácica (radiografía, TAC, ecografía) puede ayudar al diagnóstico e identificar o descartar complicaciones pulmonares.
- **Enfermedad Crítica (Síndrome de dificultad respiratoria aguda, SDRA):** inicio en la semana siguiente a la neumonía o aparición de nuevos síntomas respiratorios o empeoramiento de los existentes. Radiológicamente se expresa como opacidades bilaterales que no se explican por sobrecarga de volumen, atelectasia ni nódulos. Se acompaña de insuficiencia respiratoria

y en función de la PaO2/FiO2 se categoriza en SDRA leve, moderado o grave.

Tras la vacunación poblacional, y quizás influenciado en parte también por la propia evolución del virus y la aparición de nuevas variantes menos virulentas como Omicron, aunque sobre esto último la evidencia científica es aún limitada, en términos generales, en la fecha de elaboración de este manuscrito (enero 2022), la presentación clínica de la infección en personas vacunadas y sin enfermedades de base ha pasado a ser un cuadro más leve. Generalmente cursando con cefalea, dolor de garganta (odinofagia), más o menos rinorrea, febrícula o fiebre y dolores musculares generalizados (mialgias) siendo a su vez más recortados en el tiempo.

2.5. Presentación digestiva

Sobre todo, en los meses iniciales de la pandemia, hubo un porcentaje no desdeñable de casos en los que la infección por SARS-CoV-2 cursó de forma prácticamente exclusiva con síntomas digestivos. En un metanálisis publicado en Lancet Gastroenterology and Hepatology se ha cuantificado en un 10 % la prevalencia de sintomatología digestiva o afectación hepática. En este análisis se demostró que la frecuencia de presentación digestiva fue mayor en los pacientes de Hubei con respecto al resto de orígenes de los estudios incluidos en la revisión sistemática. (Mao *et al.* 2020). Con mayor frecuencia, consistían en deposiciones diarreicas (9,5 %, IC 95 %: 7,8-11,5) seguido por el dolor abdominal y las náuseas y los vómitos. Algunos de estos pacientes, aún sin enfermedad respiratoria grave, precisan ingreso ante la intolerancia oral y, en ocasiones, para corregir los trastornos hidroelectrolíticos asociados a la deshidratación.

2.6. Presentación bifásica

En un pequeño porcentaje de los pacientes, la COVID-19 cursa de forma bifásica. Generalmente, la aparición de la segunda fase ocurre en pacientes que han presentado desde su inicio síntomas respiratorios y fiebre elevada.

En una primera fase, denominada en las primeras publicaciones «fase viral», las manifestaciones clínicas son debidas al propio daño inducido por el virus y su replicación en los tejidos. Fundamentalmente esto ocurre en el epitelio pulmonar. Este daño es el responsable de la aparición de neumonitis y focos de condensación, correspondiente a los infiltrados pulmonares intersticiales visibles en las pruebas de imagen. Se acompaña de tos, característicamente no productiva, sensación disneica y fiebre. Analíticamente el hallazgo más frecuente es la linfopenia.

Tras una mejoría inicial, incluso con defervescencia, en algunos sujetos se produce un nuevo deterioro clínico, repunte de la temperatura y empeoramiento de la disnea. Esta segunda fase, «fase inflamatoria», es debida a la respuesta inmunitaria exagerada del huésped con una activación de una cascada de mediadores inflamatorios (citoquinas) que provocan un efecto deletéreo. Se suele acompañar de un empeoramiento de los infiltrados pulmonares, que se hacen más algodonosos, y un aumento de los reactantes de fase aguda en sangre periférica (proteína C reactiva) (Menezes 2021). En algunos pacientes, esta fase se produce de una forma explosiva, dando lugar a un fracaso multiorgánico refractario a los tratamientos y las medidas instauradas (incluso a medidas invasivas avanzadas como puede ser la hemodiafiltración como terapia de sustitución renal, sistemas de Oxigenación de Membrana Extracorpórea o ECMO...).

2.7. Evaluación del riesgo de desarrollar un cuadro grave

En un esfuerzo por prever qué pacientes serían los que desarrollarían una COVID-19 grave o crítica, y anticiparnos a ello o bien hacerles vigilancia estrecha, se han elaborado y publicado numerosas escalas pronósticas más o menos complejas en su aplicación. Entre ellas podemos encontrar la escala FenCovid que categoriza a los pacientes en distintos fenotipos (y subfenotipos) según la probabilidad de desarrollar cuadro clínico grave y, en consecuencia, probabilidad de muerte. Esta escala incluye datos demográficos, analíticos y radiológicos para su realización. Para facilitar el cálculo del fenotipo de forma fácil y semiautomatizada, dispone de una calculadora online gratuita a tal efecto (Gutierrez-Gutierrez 2021).

Estas escalas se elaboraron antes de la disponibilidad de las vacunas por lo que la aplicación y validez de las mismas sería estrictamente en pacientes no vacunados o aquellos vacunados en los que por una situación de inmunodepresión de fondo, no se espere respuesta inmune adecuada a la vacuna. Este último grupo de pacientes es el que en la actualidad centramos los esfuerzos por prevenir la infección grave con anticuerpos monoclonales en inmunización pasiva como profilaxis preexposición o, tratamiento precoz de la infección con antivirales y anticuerpos monoclonales.

3. ASPECTOS TERAPÉUTICOS

Desde el inicio de la pandemia hemos asistido a una enorme avalancha de posibles fármacos o productos sanitarios de utilidad en los pacientes con infección por SARS-CoV-2. La información sobre la utilidad de los mismos, no siempre se ha acompañado del adecuado

rigor científico ni se ha vehiculizado en ocasiones por la vía habitual de la evidencia científica. Lo abrupto de la misma, junto a su magnitud contribuyó desde el principio a esto. Y favoreció el mal uso de algunos fármacos lo cual acarreaba más efectos indeseables que beneficio real en los pacientes. Por otro lado, durante las primeras olas, se usaron fármacos también con «posible» utilidad en base a estudios *in vitro* o a experiencia en MERS o SARS.

3.1. Fármacos usados con cierta frecuencia en la primera ola, actualmente desaconsejados por haberse demostrado su falta de eficacia

Lopinavir/Ritonavir (Cao 2020; Pan 2021), hidroxicloroquina (Tang 2020; Boulware 2020), interferón (Pan 2021), azitromicina (Hinks 2021), colchicina (Recovery Group 2021). En la actualidad, para todos los fármacos anteriormente enumerados existen ensayos clínicos aleatorizados que no han demostrado eficacia por lo que su uso ya no debe incluirse en ningún protocolo de tratamiento de COVID-19. En el caso de ivermectina existen ensayos clínicos que sugieren la falta de eficacia por lo que su uso de rutina no se recomienda, quedando actualmente restringido solo para uso en el marco de ensayos clínicos (Popp 2021).

3.2. Fármacos con actividad antiviral.

Remdesivir

Es un antiviral desarrollado por Gilead cuyo uso se investigó como tratamiento para las enfermedades por virus Ébola y Marburg, y posteriormente en otros virus como el MERS y SARS. Ya en enero de 2020, Gilead comenzó las pruebas en SARS-CoV-2. Actualmente su uso está recomendado si se necesita oxigenoterapia de bajo flujo para mantener SatO2 >94%. Si bien se discute si el uso de este fármaco se asocia con una disminución relevante de la mortalidad, en un ensayo clínico su uso se asoció con disminución en el tiempo de recuperación. Se ha de utilizar de forma precoz, recogiéndose en las recomendaciones el máximo de 10 días de evolución de los síntomas para su uso. En pacientes inmunodeprimidos en los que parece que la replicación viral pueda ser algo más mantenida en el tiempo, se podría considerar la administración de ciclos repetidos de remdesivir. Todas sus especificaciones se recogen en el Protocolo Farmacoclínico del Ministerio de Sanidad (Gil-Tornero 2020). Desde el mes de julio de 2023, se retiró de ficha técnica la restricción de uso en pacientes con insuficiencia renal, pudiéndose administrar en pacientes con cualquier filtrado glomerular e incluso en hemodiálisis.

Además de tratamiento de COVID-19 moderado-grave, la Comisión Europea – EMA aprobó el uso de remdesivir de forma precoz en pacientes sin requerimiento de oxígeno, pero con riesgo de evolución a enfermedad grave. En estos casos se usaría durante 3 días, en dosis de 200 mg el primer día y 100 mg al día los días 2 y 3.

Nuevos antivirales

En la actualidad hay varias moléculas ya aprobadas para la prevención de evolución a enfermedad grave en pacientes vulnerables, si se administran en los primeros cinco días de síntomas.

La primera de ellas, molnupinavir, contó con autorización de urgencia de las agencias reguladoras para su uso en humanos y en sus estudios ha demostrado la reducción del riesgo de hospitalización y muerte en un 30% administrado de forma precoz en los cinco primeros días de síntomas. Se presenta en cápsulas de 800 mg, siendo su posología 800 mg cada 12 horas durante 5 días. No requiere ajustes en insuficiencia renal. Los ensayos clínicos y su uso en práctica clínica habitual, reportó buena tolerancia al fármaco sin efectos secundarios destacables. No obstante, en fechas posteriores, se suspendió su comercialización en Europa por escasa rentabilidad, si bien, se puede seguir solicitando es casos puntuales, como uso compasivo.

La segunda de las moléculas referidas, denominada nirmatrelvir, ha demostrado una eficacia del 89% de forma global en la hospitalización o muerte, comparado con placebo, cuenta con la autorización por las agencias reguladoras. En concreto ha de administrarse junto a ritonavir, en los primeros días de la enfermedad. Se presenta en capsulas de 150 mg de nirmatrelvir, siendo la posología 300 mg de nirmatrelvir (2 cápsulas) más 100 mg de ritonavir (1 cápsula) administradas juntas dos veces al día durante 5 días. En caso de insuficiencia renal con filtrado glomerular (FG) 30-60 ml/min debe reducirse a 150/100 cada 12 h. Se encuentra contraindicado su uso en pacientes con FG <30 ml/min. El principal inconveniente de este tratamiento son las interacciones farmacológicas con ritonavir que han de revisarse al detalle antes de iniciar el tratamiento. Como evento adverso más reportado por los pacientes se encuentra la disgeusia. En una nota de prensa publicada el 14 de diciembre de 2021, se muestran los resultados preliminares derivados de análisis interino del EPIC-HR y EPIC-SR, obteniendo dichos análisis aparentemente buenos resultados. Estos datos son más consistentes en el grupo de sujetos no vacunados y con algún factor de riesgo de gravedad añadido (HR), sin aportar gran beneficio añadido al grupo de pacientes vacunados y sin riesgo añadido (SR).

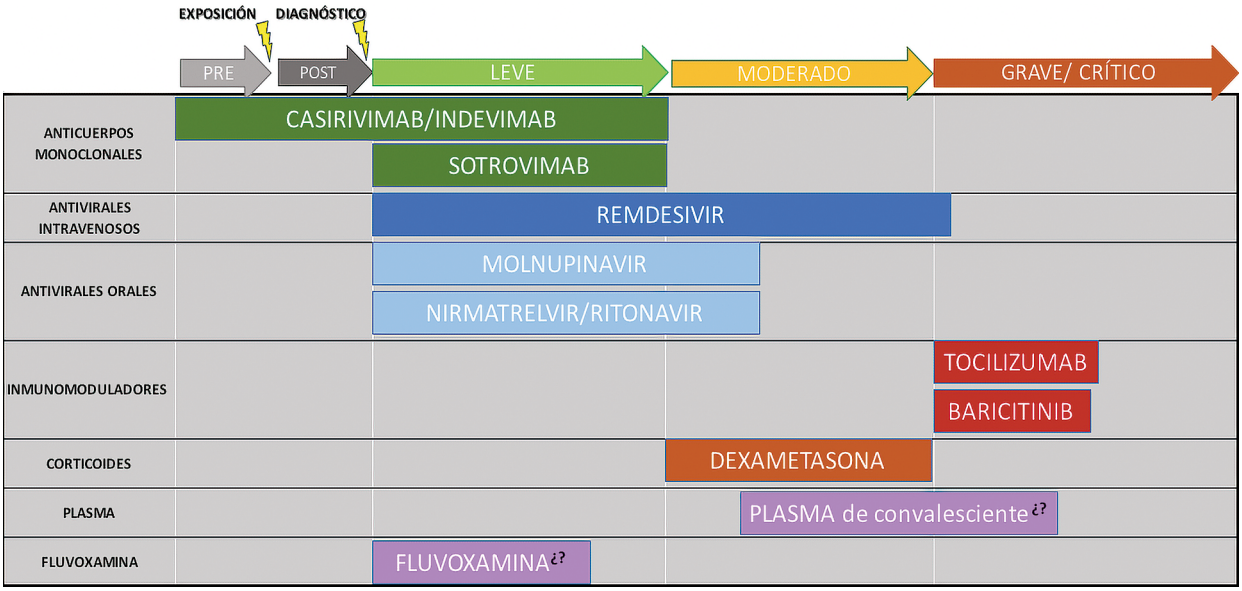


Figura 3. Tratamiento

Anticuerpos monoclonales

El uso de anticuerpos monoclonales se ha estudiado en varios escenarios clínicos:

1. Pacientes con presentación clínica leve en el momento del diagnóstico, pero con factores de riesgo de poder evolucionar a enfermedad grave (edad avanzada, obesidad, enfermedad cardiovascular, diabetes, enfermedad renal crónica, inmunodeprimidos, etc.).
2. En pacientes hospitalizados seronegativos para SARS-CoV-2.
3. Como profilaxis postexposición en personas con factores de riesgo de enfermedad grave, tras un contacto estrecho con un caso confirmado.
4. Como profilaxis preexposición en personas vacunadas en las que, por circunstancias de inmunosupresión de fondo, se demuestra la no respuesta vacunal.

Debe considerarse la actividad de cada fármaco o combinación de los mismos para las variantes virales circulantes.

Casirivimab/indevimab se asoció con una reducción del 20 % en la mortalidad en los pacientes seronegativos, sin demostrar ningún efecto en pacientes seropositivos (Weinreich 2021). Se ha aprobado su uso tanto para el tratamiento precoz (en los primeros 5 días de síntomas preferentemente) como en profilaxis postexposición, así como en profilaxis preexposición en personas de especial riesgo. Se administra en una dosis única intravenosa o subcutánea. A la fecha de redacción de este capítulo, existen evidencias a favor y en contra del efecto de esta combinación frente a algunas variantes de SARS-CoV-2 que ya están circulando, con datos de probable ineficacia frente a la variante omicron.

Sotrovimab ha sido aprobado por la AEMPs para su solicitud a través del Ministerio de Sanidad en base al ensayo clínico COMET-ICE (Gupta 2021) en pacientes con sintomatología de COVID-19 leve, no hospitalizados, sin respuesta vacunal (medida mediante IgG anti S <260 BAUs), a partir de 18 años con comorbilidades o a partir de 55 años independientemente de las comorbilidades en aquellos casos confirmados, con satO2 >94 % en los primeros días de síntomas. La administración es en dosis única inravenosa de 500 mg a infundir en 30 minutos. Es muy bien tolerado. No hay interacciones farmacológicas descritas. No precisa ajustes en insuficiencia renal o hepática. En la fecha de redacción de este capítulo, es el anticuerpo monoclonal disponible que mejor perfil de neutralización presenta frente a las nuevas variantes de omicron circulantes. Además, por su diseño, este anticuerpo monoclonal conserva alta capacidad efectora (a costa de perder vida media), lo cual permite esa segunda vía de activación del sistema inmunológico, detectando células ya infectadas y activando la apoptosis de las mismas mediada por células NK, o la fagocitosis mediada por macrófagos.

Los ensayos clínicos con bamlanivimab y la combinación BRII-196/BRII-198 fueron interrumpidos prematuramente al no mostrar beneficio frente al tratamiento con remdesivir más dexametasona. Si bien no se había diferenciado según el estatus serológico de los participantes y los análisis posteriores estratificados en este sentido, sí sugerían beneficio en pacientes seronegativos (Barkauskas 2021; Dougan 2021; Cohen 2021).

Bebtelovimab conserva a la fecha de redacción de este capítulo buen perfil de neutralización de las nuevas variantes, pero no se encuentra disponible en España.

Durante el año 2022 tixagevimab/cilgavimab contó con la autorización para su uso en profilaxis preexposición en pacientes vacunados, pero con circunstancias subyacentes de inmunosupresión, en los que se demuestra una escasa o nula respuesta vacunal (punto de corte de IgG anti S establecido en <260 BAUs). Su administración es en dosis única intramuscular de 300 mg de cada fármaco en un mismo acto. A diferencia de sotrovimab, este fármaco conserva una vida media larga, y es por eso por lo que se utilizaba en profilaxis preexposición. A la fecha de revisión de este capítulo, ha perdido la capacidad de neutralización de las variantes circulantes.

En fases avanzadas de investigación previo a comercialización, se encuentra otro anticuerpo monoclonal, actualmente denominado AZD3152, del que se espera una actividad más «panvariante» y una vida media de al menos 6 meses, que vendría a ocupar el hueco que se ha quedado sin cubrir en la profilaxis preexposición al perder la capacidad neutralizante las opciones previamente mencionadas.

En general, ninguno de los anticuerpos monoclonales disponibles se ha evaluado en pacientes con altos requerimientos de oxígeno o ventilación mecánica invasiva o no invasiva, por lo que se desconoce su efecto en este grupo de pacientes.

3.3. Fármacos con actividad antiinflamatoria o inmunomoduladora

Corticoides

El principio activo recomendado preferentemente es la dexametasona en dosis oral de 6 mg (o su equivalente intravenoso de 8 mg) durante 7 a 10 días (WHO 2020). Se recomienda su uso en caso de que se necesite O2 a bajo flujo para mantener satO2 >94 %, habiendo demostrado impacto moderado en disminución de la mortalidad. Los ensayos clínicos realizados con dosis más altas no han podido demostrar de forma estadísticamente significativa mayor beneficio a largo plazo en pacientes graves-críticos (The COVID STEROID 2 Trial Group 2021). En los casos leves, sin embargo, existe recomendación en contra del uso de la misma. Aunque se postula que la medición de marcadores de inflamación pueda ser de ayuda a la hora de iniciar terapia corticoidea, aún no hay evidencia para ello.

Es importante considerar y en su caso prevenir la hiperinfestación por *Strongyloides stercolaris* cuando se usen corticoides u otros inmunodepresores, en personas procedentes de áreas de riesgo o con serología positiva para este parásito.

Tocilizumab

Es un inhibidor selectivo de IL-6 que se ha usado en tratamiento de enfermedades reumatoideas como la artritis reumatoide. Está recomendado su uso, añadido a dexametasona si ésta en monoterapia previa no se ha acompañado de mejoría clínica. También está indicado junto a dexametasona desde el inicio del tratamiento en aquellos casos con SatO2 <92 % (basal o a pesar de O2 en bajo flujo) y con PCR>75mg/dL. En las últimas guías también se ha introducido su indicación en casos de deterioro clínico rápido con aumento brusco de los requerimientos de oxígeno al ingreso de los pacientes.

Estas indicaciones se basan en los resultados del ensayo clínico RECOVERY, entre otros, donde se aleatorizó al uso de tocilizumab versus «standard of care» a pacientes con saturación de oxígeno <92 % o que precisaron oxigenoterapia y que tuvieron parámetros inflamatorios definidos como proteína C reactiva ≥75 mg/L. La mortalidad de ambos grupos fue 29 % versus 33 % p = 0,007 (IC 0,77-0,96). En particular el mayor beneficio en mortalidad fue en aquellos pacientes que concomitantemente recibieron corticoides. Entre los pacientes que no recibían ventilación mecánica invasiva al inicio del estudio, los pacientes asignados a tocilizumab menos frecuentemente alcanzaron el criterio compuesto de ventilación mecánica invasiva o muerte (33 % frente a 38 % [IC 95 %: 0,78-0,93]; p = 0,0005) (Recovery Group 2021).

Baricitinib

De perfil similar a tocilizumab, en este caso actúa inhibiendo la Janus Kinasa, estaría indicado solo como alternativa al mismo y/o como alternativa a corticoides cuando estos estén contraindicados por algún motivo. Tiene la ventaja de la administración vía oral y de una menor vida media.

Sarilumab

En caso de no disponibilidad de tocilizumab o sarilumab, se podría emplear este otro inhibidor de la IL-6.

Anakinra

Este fármaco ha demostrado utilidad en algún ensayo clínico. Su administración se hace guiada por el nivel sérico del receptor soluble de la urokinasa. Actualmente su uso queda enmarcado solo en el contexto de ensayos clínicos en pacientes hospitalizados (Kyriazopoulou 2021).

3.4. Plasma hiperinmune

Se podría considerar el uso de plasma hiperinmune para el tratamiento de pacientes con COVID-19 que cumplan los siguientes criterios:

1. Edad >74 años (o 64-74 si se acompaña de condición de riesgo: hipertensión, diabetes, obesidad con IMC > 30, insuficiencia renal crónica, enfermedad cardiovascular, EPOC).
2. Tª ≥ 37,5° más al menos un síntoma respiratorio, ambos con menos de 72 h de evolución.
3. Ausencia de insuficiencia respiratoria grave.
4. En combinación con remdesivir en paciente inmunodeprimido con replicación viral persistente y ausencia de respuesta humoral natural.

En el momento de elaboración del presente capítulo existen datos a favor y en contra de su utilidad derivados de diversos ensayos clínicos por lo que no existe una recomendación firme de su uso.

3.5. Otros

Células mesenquimales

Actualmente, el potencial uso como inmunomodulador de las células mesenquimales troncales adultas alogénicas, en pacientes con criterios de gravedad ingresados por neumonía COVID-19 solo está aprobado en el marco de ensayos clínicos (AdiQure-COVID-19, EudraCT number 2020-001364-29).

Fluvoxamina

Este medicamento es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina ampliamente utilizado como antidepresivo. Se le han atribuido también efectos antiinflamatorios y antiplaquetarios.

Tiene dos ensayos clínicos en los que se ha demostrado una reducción en la progresión a enfermedad grave o a hospitalización cuando se usa de forma precoz tras el diagnóstico de COVID-19. En este sentido, en el ensayo clínico STOP COVID (Lenze 2020) el grupo que recibió el fármaco (frente a los que recibieron placebo), presentó menor porcentaje de deterioro clínico medido el día 15. El ensayo STOP COVID 2 fue parado tras un análisis interino por futilidad probablemente por el bajo número de casos reclutables (influenciado con casi toda seguridad por la vacunación) y no encontrar diferencias entre ambos grupos. Por otro lado, en el ensayo clínico TOGETHER (Reis 2021), el tratamiento con fluvoxamina de forma precoz en pacientes diagnosticados de COVID-19 con factores de riesgo de progresión a enfermedad grave, redujo de forma significativa la necesidad de hospitalización.

Existe un metanálisis (Lee 2022) realizado mediante aproximación Bayesiana que incluye precisamente estos tres ensayos en el que con una alta probabilidad (94,1-98,3 %) fluvoxamina reduce la frecuencia de hospitalización con un riesgo de 0,75 (IC95 % 0,57-0,97). En la actualidad, existen más ensayos clínicos en marcha, tanto para confirmar estos resultados como para encontrar la mínima dosis útil.

BIBLIOGRAFÍA

ACKERMAN, C.M., MYHRVOLD, C., THAKKU, S.G., FREIJE, C.A., METSKY, H.C. *et al.* (2020), Massively Multiplexed Nucleic Acid Detection with Cas13. Nature 582: 277-282.

ALEKSEENKO, A., BARRETT, D., PAREJA-SANCHEZ, Y., HOWARD, R.J., STRANDBACK, E. *et al.* (2021), Direct Detection of SARS-CoV-2 Using Non-Commercial RT-LAMP Reagents on Heat-Inactivated Samples. Scientific Reports 11(1): 1820 (10 pp).

ANASTASIOU, O.E., HOLTKAMP, C., SCHÄFER, M., SCHÖN, F., EIS-HÜBINGER, A.M. *et al.* (2021), Fast Detection of SARS-CoV-2 RNA Directly from Respiratory Samples Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Test. Viruses 13(5): 801 (12 pp).

AVANZATO, V.A., MATSON, M.J., SEIFERT, S.N., PRYCE, R., WILLIAMSON, B.N. *et al.* (2020), Case Study: Prolonged Infectious SARS-CoV-2 Shedding from an Asymptomatic Immunocompromised Individual with Cancer. Cell 183: 1901-1912.e9.

BARKAUSKAS, E., HOLLAND, T. L., GOTTLIEB, R. L. *et al.* Clinical and Virological Response to a Neutralizing Monoclonal Antibody for Hospitalized Patients with COVID-19 by the ACTIV-3/TICO Bamlanivimab Study Group; https://doi.org/10.1101/2021.07.19.21260559

BERENGUER, J., BOROBIA, A.M., RYAN, P., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., BELLÓN, J.M., JARRÍN, I. *et al.* (2021), Development and Validation of a Prediction Model for 30-Day Mortality in Hospitalised Patients with COVID-19: The COVID-19 SEIMC Score. Thorax 76(9): 920-929.

BOHN, M.K., MANCINI, N., LOH, T.P., WANG, C.B., GRIMMLER, M. *et al.* (2020), IFCC Interim Guidelines on Molecular Testing of SARS-CoV-2 Infection. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 58: 1993-2000.

BOULWARE, D.R. *et al.* (2020), A Randomized Trial of Hydroxychloroquine as Postexposure Prophylaxis for COVID-19. New England Journal of Medicine 2020; 383(6): 517-525.

CARLA, C., GONZÁLEZ, F., TOMÁS, M. & OLIVER, A. (2021), Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica n.º 71. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

CAO, B. *et al.* (2020), A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe COVID-19. New England Journal of Medicine 382(19): 1787-1799.

CDC (2020), Centers for Disease Control and Prevention. Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).

CDC (2021a), Centers for Disease Control and Prevention, COVID-19. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2. Updated May 13, 2021.

CDC (2021b), Centers for Disease Control and Prevention, Classifications and Definitions of SARS-CoV-2 variants. Update December 2021.

CDC (2022), Centers for Disease Control and Prevention, Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing. Updated December 2022.

CHENG, M.P., YANSOUNI, C.P., BASTA, N.E., DESJARDINS, M., KANJILAL, S. *et al.* (2020), Serodiagnostics for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. Annals of Internal Medicine 173: 450-460.

CILLA, G., NAVARRO, J.M., GALÁN, J.C., FOLGUEIRA, M.D., PUMAROLA, T. *et al.* (2021), Diagnóstico microbiológico de la infección por SARS-CoV-2. Procedimientos en Microbiología Clínica n.º 73. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

COHEN, M.S., NIRULA, A., MULLIGAN, M.J. *et al.* (2021), Effect of Bamlanivimab vs Placebo on Incidence of COVID-19 among Residents and Staff of Skilled Nursing and Assisted Living Facilities. JAMA 326(1): 46.

DAHDOUH, E., LÁZARO-PERONA, F., ROMERO-GÓMEZ, M.P., MINGORANCE, J. & GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. (2021), Ct Values from SARS-CoV-2 Diagnostic PCR Assays Should Not Be Used as Direct Estimates of Viral Load. Journal of Infection 2021; 82: 414-451.

DAN, J.M., MATEUS, J., KATO, Y.U., HASTIE, K.M., YU, E.D. *et al.* (2021), Immunological Memory to SARS-CoV-2 Assessed for up to Eight Months after Infection. Science. 2021; 371(6529).

DOUGAN, M., NIRULA, A., AZIZAD, M. *et al.* (2021), Bamlanivimab Plus Etesevimab in Mild or Moderate COVID-19. New England Journal of Medicine 385(15): 1382-1392.

ECDC (2020a), European Centre for Disease Prevention and Control, Options for the Use of Rapid Antigen Tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK. 19 November 2020. ECDC: Stockholm.

ECDC (2020b), European Centre for Disease Prevention and Control, Sequencing of SARS-CoV-2.

ECDC (2023), Centers for Disease Control and Prevention, SARS-CoV-2 Variants of Concern. Update September 2023.

ELLINGHAUS, D. *et al.* (2020), The Severe COVID-19 GWAS Group Genomewide Association Study of Severe COVID-19 with Respiratory Failure. New England Journal of Medicine 383: 1522-1534.

GIL-TORNERO, L. *et al.* Protocolo farmacoclínico del uso de Remdesivir (Veklury®) en el tratamiento de la Enfermedad por COVID-19 en el Sistema Nacional de Salud; https://www.mscbs.gob.es/profesionales/farmacia/valtermed/docs/20200908_Protocolo_farmacoclinico_remdesivir2.pdf

GUPTA, A., GONZALEZ-ROJAS, Y., JUAREZ, E., CRESPO CASAL, M., MOYA, J., FALCI, D.R. *et al.* (2021), COMET-ICE Investigators. Early Treatment for COVID-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. New England Journal of Medicine 385(21): 1941-1950.

GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, B., DEL TORO, M.D. *et al.* (2021), On Behalf of the REIPI-SEIMC COVID-19 Group and COVID@HULP Groups. Identification and Validation of Clinical Phenotypes with Prognostic Implications in Patients Admitted to Hospital with COVID-19: A Multicenter Cohort Study. The Lancet Infectious Diseases 21: 783-792.

HINKS, T.S.C. *et al.* (2021), Azithromycin versus Standard Care in Patients with Mild-to-Moderate COVID-19 (ATOMIC2): An Open-Label, Randomised Trial. Lancet Respiratory Medicine 9: 1130-1140.

KYRIAZOPOULOU, E. *et al.* (2021), Early Treatment of COVID-19 with Anakinra Guided by Soluble Urokinase Plasminogen Receptor Plasma Levels: A Double-Blind, Randomized Controlled Phase 3 Trial. Nature Medicine 27(10): 1752-1760.

LANZE, E. *et al.* (2020), Fluvoxamine vs Placebo and Clinical Deterioration in Outpatients with Symptomatic COVID-19: A Randomized Clinical Trial. JAMA 324(22): 2292-2300.

LEE, T.C., VIGOD, S., BORTOLUSSI-COURVAL, E., ..., LENZE, E., REIERSEN, A.M. & McDONADL, E. (2022), Fluvoxamine for Outpatient Management of COVID-19 to Prevent Hospitalization: A Systematic Review and Meta-Analysis. JAMA Network Open 5(4): e226269.

LONG, Q.X., LIU, B.Z., DENG, H.J., WU, G.C., DENG, K. *et al.* (2020), Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with COVID-19. Nature Medicine 26: 845-848.

LUDWIG, S. & ZARBOCK, A. (2020), Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. Anesthesia Analgesia 131(1): 93-96.

MAO, R., QIU, Y., HE, J., ..., NG, S.C., GHOST, S. & CHEN, M-H. (2020), Manifestations and Prognosis of Gastrointestinal and Liver Involvement in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. The Lancet Gastroenterology and Hepatology 5(7): 667-678.

MARKS, M., MILLAT-MARTINEZ, P., OUCHI, D., ROBERTS, C.H., ALEMANY, A. *et al.* (2021), Transmission of COVID-19 in 282 Clusters in Catalonia, Spain: A Cohort Study. The Lancet Infectious Diseases 21: 629-636.

MATIC, N., LOWE, C.F., RITCHIE, G., STEFANOVIC, A., LAWSON, T. *et al.* (2021), Rapid Detection of SARS-CoV-2 Variants of Concern, Including B.1.1.28/P.1, in British Columbia, Canada. Emergent Infectious Diseases 27: 1673-1676.

MENEZES, M.C., VINICIUS, D. *et al.* (2021), SARS-CoV-2 Pneumonia-Receptor Binding and Lung Immunopathology: A Narrative Review. Critical Care 25: 53.

METLAY, J.P., WATERER, G.W., LONG, A.C. *et al.* (2019), Diagnosis and Treatment of Adults with Community-Acquired Pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 200: 45-e67.

MINA, M.J., PARKER, R. & LARREMORE, D.B. (2020), Rethinking COVID-19 Test Sensitivity – A Strategy for Containment. New England Journal of Medicine 383(22): e120 (3 pp).

MSGE (2020), Ministerio de Sanidad Gobierno de España. La tecnología CRISPR en SARS-CoV-2. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Sanidad.

MSGE (2021a), Ministerio de Sanidad Gobierno de España. Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19. Actualización 1 de diciembre de 2021.

MSGE (2021b), Ministerio de Sanidad Gobierno de España. Integración de la Secuenciación genómica en la vigilancia del SARS-CoV-2. Actualización 15 de noviembre de 2021.

MSGE (2023a), Ministerio de Sanidad Gobierno de España (2023). Protocolo para la vigilancia centinela de Infección respiratoria aguda (IRAs) en Atención Primaria en España. Temporada 2023-24. Actualización 27 de septiembre de 2023.

MSGE (2023b), Ministerio de Sanidad Gobierno de España (2023). Protocolo para la vigilancia centinela de infección respiratoria aguda grave (IRAG) en hospitales en España. Temporada 2023-24. Actualización 27 de septiembre de 2023.

NA, Z., DINGYU, Z., WENLING, W., XINGWANG, L., BO, Y. *et al.* (2020), A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine 382: 727-733.

PASCARELLA, G., STRUMIA, A., PILIEGO, C., BRUNO, F., BUONO, R. DEL, COSTA, F. *et al.* (2020), COVID-19 Diagnosis and Management: A Comprehensive Review. Journal of Internal Medicine 288(2): 192-206.

PAN, H. *et al.* (2021), Repurposed Antiviral Drugs for COVID-19 – Interim WHO Solidarity Trial Results. New England Journal of Medicine 384: 497-511.

POPP, M. *et al.* (2021), Ivermectin for Preventing and Treating COVID-19. Cochrane Database of Systematic Reviews 7(7): CD015017. www.cochranelibrary.com. Accessed October 6, 2021; https://www.cochrane.org/CD015017/INFECTN_ivermectinpreventing-and-treating-covid-19

RECOVERY GROUP (2021), Tocilizumab in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. The Lancet 397: 1637-1645.

RECOVERY GROUP (2021), Colchicine in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. The Lancet Respiratory Medicine 19: 1-8.

REIS, G. *et al.* (2022), Effect of Early Treatment with Fluvoxamine on Risk of Emergency Care and Hospitalization among Patients with COVID-19: The TOGETHER Randomized, Platform Clinical Trial. The Lancet Global Health 10: e42-51.

SHERIDAN, C. (2020), Fast, Portable Tests Come Online to Curb Coronavirus Pandemic. Nature Biotechnology 38: 515-518.

TANG, W. *et al.* (2020), Hydroxychloroquine in Patients with Mainly Mild to Moderate Coronavirus Disease 2019: Open Label, Randomised Controlled Trial. BMJ 369: m1849.

The COVID STEROID 2 Trial Group (2021), Effect of 12mg vs 6 mg of Dexamethasone on the Number of Days Alive without Life Support in Adults with COVID-19 and Severe Hypoxemia: The COVID STEROID 2 Randomized Trial. JAMA 326(18): 1807-1817.

TO, K.K., TSANG, O.T., LEUNG, W.S., TAM, A.R., WU, T.C. *et al.* (2020), Temporal Profiles of Viral Load in Posterior Oropharyngeal Saliva Samples and Serum Antibody Responses during Infection by SARS-CoV-2: An Observational Cohort Study. The Lancet Infectious Diseases 20: 565-574.

WEINREICH, D.M., SIVAPALASINGAM, S., NORTON, T. *et al.* (2021), REGN-COV2, a Neutralizing Antibody

Cocktail, in Outpatients with COVID-19. New England Journal of Medicine 384(3): 238-251.

WHO (World Health Organization) 2020, Corticosteroids for COVID-19. https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Corticosteroids-2020.1

WHO (World Health Organization) (2020a), Antigen-detection in the Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection Using Rapid Immunoassays. Interim guidance. 11 September 2020.

WHO (World Health Organization) (2020b), Diagnostic Testing for SARS-CoV-2. Interim Guidance 11 September 2020.

WHO (World Health Organization) (2020), Clinical Management of Severe Acute Respiratory Infection When COVID-19 Disease Is Suspected: Interim Guidance, 13 March 2020. World Health Organization; https://appswho.int/iris/handle/10665/331446. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

WHO (World Health Organization) (2021), Laboratory Biosafety Guidance Related to Coronavirus Disease (COVID-19). Interim Guidance, 28 January 2021.

WHO (World Health Organization) (2023), Updated Working Definitions and Primary Actions for SARS-CoV-2 Variants, 4 October 2023.

WIERSINGA, W.J., RHODES, A., CHENG, A.C., PEACOCK, S.J. & PRESCOTT, H.C. (2020) Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). A Review. JAMA 324(8): 782-793.

WÖLFEL, R., CORMAN, V.M., GUGGEMOS, W., SEILMAIER, M., ZANGE, S. *et al.* (2020), Virological Assessment of Hospitalized Patients with COVID-2019. Nature. 2020; 581: 465-469.

ZHENG, M. & SONG, L. (2020), Novel Antibody Epitopes Dominate the Antigenicity of Spike Glycoprotein in SARS-CoV-2 Compared to SARS-CoV. Cellular & Molecular Immunology 17(5): 536-538.

ZHU, X., WANG, X., LI, S., LUO, W., ZHANG, X. *et al.* (2021), Rapid, Ultrasensitive, and Highly Specific Diagnosis of COVID-19 by CRISPR-Based Detection. ACS Sensors 6(3): 881-888.

Capítulo III
Pandemia COVID-19: análisis clínicos, laboratorios clínicos, medicina de laboratorio

Carlos Gómez Canga-Arguelles
Academia de Farmacia Castilla y León. Valladolid

El laboratorio clínico está siendo una pieza fundamental en la actual pandemia COVID-19, interviniendo tanto en el diagnóstico de la infección, detectando el virus SARS-CoV-2 por técnicas moleculares y serológicas (RT PCR, anticuerpos IgM, IgG), como en la realización de las pruebas necesarias para el correcto seguimiento, pronóstico, y colaboración en las decisiones terapéuticas. Asimismo, se han elaborado protocolos de actuación para futuras epidemias o pandemias. Se ha incluido una breve introducción histórica de la especialidad de Análisis Clínicos que da visibilidad a su carácter pluridisciplinar.

La especialidad de Análisis Clínicos se inicia científicamente a finales del siglo XIX: el método experimental se incorporó a la investigación y al pensamiento médicos a través de la fisiología, aprovechando la oportunidad que para el desarrollo de la ciencia médica significó la utilización de los grandes hospitales públicos. El francés François Magendie, el británico Marshall May, el suizo Mortiz Schiff y el alemán Johannes Müller fueron los pioneros en esta ciencia y marcaron la transición desde la fisiología especulativa a otra experimental y analítica.

La fisiología experimental del francés Claude Bernard, recogida en su libro *Introducción al estudio de la Medicina Experimental*, tuvo gran repercusión en Europa y también en España. Constituyó el principal referente de la aplicación del desarrollo de los avances en las ciencias del laboratorio, y su obra fue el estandarte del movimiento positivista renovador de la medicina española. Los libros de texto universitarios de fisiología de Juan Magaz, José Moreno Fernández, Juan Aguilar y Lara, y otros, se referían a la revolución metodológica impulsada por Bernard a favor de la experimentación.

El impacto de la obra de Claude Bernard desbordó los límites estrictos de la fisiología convirtiendo el hospital en el lugar esencial para la investigación médica. Los laboratorios comenzaron a transformar la fisiología y la patología y a dejar su huella también en la formación médica. Quienes se dedicaban a la química orgánica, a la microscopía, a la fisiología y a otras disciplinas relacionadas con la medicina en el siglo XIX, se percibieron que mientras el hospital era el lugar adecuado para realizar observaciones, en el laboratorio se efectuaba una experimentación controlada y sistemática de estas, y que debían estudiarse de forma objetiva por diferentes métodos y técnicas con el fin de generar nuevos conocimientos.

Durante el siglo XX, con el importante crecimiento experimentado por el conocimiento científico, surgieron numerosas nuevas disciplinas en el campo de la medicina, entre las que destacamos la química biológica o bioquímica, la histología, anatomía patológica, genética, embriología, microbiología... que se engloban dentro del área de conocimiento que llamamos biomedicina.

La biomedicina aplica todos los principios de las ciencias mencionadas en la práctica clínica, mediante el estudio e investigación de los procesos fisiopatológicos, abordando tanto las interacciones moleculares como el funcionamiento dinámico del organismo. Todo ello nos ha permitido perfeccionar el diagnóstico precoz de enfermedades con nuevos biomarcadores de los procesos fisiopatológicos, así como descubrir nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos innovadores.

Podemos constatar que en las últimas décadas del siglo XX y principios del XXI, se toman muchas medidas diagnósticas y terapéuticas basadas en la tecnología

biomédica o biotecnología. Estamos asistiendo a un cambio en el concepto de enfermedad, y en las posibilidades de conocer los detalles de su etiopatología, que nos ha permitido tomar decisiones médicas impensables hace unos años.

En España, se establecieron dos núcleos de vanguardia, localizados en Madrid y Barcelona. Ambas universidades fueron el alma mater de científicos de primera línea, que serían, en definitiva, el punto de partida de los grupos de investigación que, desde principios del siglo XX, elevaron el rango de la investigación fisiológica en España.

El despliegue institucional de la fisiología catalana giró en torno a August Pi i Sunyer y sus discípulos Jesús María Bellido Golferichs y Rosendo Carrasco Formiguera, todos ellos protagonistas de una etapa de investigación experimental sin precedentes y maestros de una generación de grandes fisiólogos.

En Madrid, el gran peso de esta labor recayó sore todo en la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas (JAE), fundada en 1907. Presidida por Ramón y Cajal, fue un instrumento central de las políticas regeneracionistas. Bajo la misma inspiración que la JAE se creó en 1910 la Residencia de Estudiantes, dirigida desde su fundación por Alberto Jiménez Fraud.

Pero debemos evocar que, anteriormente en 1903, el farmacéutico y profesor de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, José Rodríguez Carracido había publicado el libro *Tratado de Química Biológica*, pionero de los estudios de bioquímica en España.

A partir de 1912 se inició la creación de pequeños laboratorios para la enseñanza práctica universitaria y para la iniciación a la investigación. Estaban ubicados en los sótanos de la Residencia de Estudiantes. A continuación, se fundó el Laboratorio de Serología y Bacteriología, cuyo director fue Paulino Suárez.

En la memoria publicada por la JAE en 1919, sobre los trabajos e investigaciones realizados durante el curso 1918-1919, se resalta que los trabajos de química se asociaban y complementaban a las prácticas de Laboratorio de la Facultad de Farmacia. Se realizaban bajo la dirección de los profesores farmacéuticos José Rodríguez Carracido y Antonio Madinaveitia. Eran trabajos de química biológica dedicados a estudios de farmacodinamia. Asimismo, también se impartían cursos breves de análisis clínicos de orina, sangre, heces, y otros productos biológicos.

En este breve recuerdo histórico de la aportación del laboratorio a la medicina, hemos de destacar la importancia de los descubrimientos en microbiología, parasitología, inmunología y nutrición, y su repercusión en la mejora del diagnóstico biológico y del tratamiento terapéutico de las enfermedades. La ciencia y la práctica médica basadas en la investigación experimental constituyen la denominada «medicina de laboratorio». Al ser una actividad multidisciplinar, la especialidad fue denominada Análisis Clínicos, y ha sido el origen histórico de otras especialidades relacionadas con el laboratorio como Bioquímica Clínica, Hematología, Inmunología, Microbiología y Parasitología, y de otras áreas como la Genética.

He tenido el honor de pertenecer a la Comisión Nacional de Análisis Clínicos del Ministerio de Sanidad, primero como vocal, después como secretario, y finalmente como presidente. En la última Guía de Formación de los Residentes en la que participé en el año 2004, definíamos la especialidad de Análisis Clínicos como la especialidad que, desde el profundo conocimiento de la patología humana y de los métodos de análisis de muestras biológicas de origen humano, tiene como misión generar información de utilidad para la clínica en los siguientes aspectos:

a) Distinguir los estados de salud y de enfermedad.
b) Ayudar al correcto diagnóstico de las enfermedades.
c) Contribuir al establecimiento del pronóstico de las mismas.
d) Facilitar el seguimiento clínico.
e) Asegurar la eficacia del tratamiento aplicado.

Por ello, el Especialista en Análisis Clínicos se integra como un componente fundamental en el equipo multidisciplinar, que, junto al resto de especialistas clínicos, participa en el proceso de decisión clínica, que afecta a las tareas de prevención de la enfermedad, promoción de la salud y cuidado del paciente. Por otro lado, no se entendería que los profesionales del laboratorio clínico permaneciesen aislados de las grandes líneas de investigación, cuando son ellos los que en muchas ocasiones realizan las determinaciones donde se objetivan los resultados de las mismas.

Hemos querido realizar esa introducción para dar visibilidad al papel que ha llevado a cabo el laboratorio clínico en la actual pandemia de COVID-19.

La crisis sanitaria y social derivada de la pandemia COVID-19 ha requerido afrontar una serie de relevantes retos. Avanzar en el conocimiento de un virus desconocido hasta ahora, aplicar los mejores procedimientos para su diagnóstico por el laboratorio y la clínica, tratar y prevenir la infección, constituyen los principales desafíos científicos de la actualidad.

Mucho se ha escrito y difundido por las redes sociales sobre la ingente y heroica labor de todos los sanitarios desde el médico asistencial a todo el personal auxiliar. Particularmente he echado de menos que no se mencione también a los farmacéuticos, al personal de las farmacias, y a los veterinarios, sobre todo a nivel estatal, no así a nivel autonómico, donde si se ha reconocido esta actividad sanitaria de primera línea. Ahí están nuestros compañeros que han entregado su vida y/o se han contagiado con la enfermedad en el ejercicio cotidiano de la actividad asistencial SANITARIA.

En el período de confinamiento han sido frecuentemente mencionados y popularizados los test de la PCR y las llamadas técnicas rápidas de detección de anticuerpos, así como su significación diagnóstica, cómo y cuándo se debían efectuar, y la falta de reactivos para realizarlos, reemplazando a otras noticias habituales incluso en los programas radiofónicos audiovisuales deportivos. Sin embargo, con esta popularización se han originado equívocos y dudas entre el público que han contribuido en ocasiones, a incrementar el desasosiego y la incertidumbre que produce la situación actual. En mi condición de profesional del laboratorio clínico quiero contribuir con algunas reflexiones sobre el papel que aportan las ciencias del laboratorio y los profesionales que trabajamos en ellas.

Los servicios centrales de los hospitales (Radiología, Laboratorios clínicos, Farmacia Hospitalaria) son departamentos a los que se le da poca visibilidad, pero que prestan un servicio sanitario imprescindible para la asistencia médica clínica.

El laboratorio clínico ha sido utilizado por las autoridades sanitarias como centro esencial de la lucha contra la enfermedad COVID-19, dado que una de las principales recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha sido realizar un adecuado cribado de la población para detectar el alcance real de la infección.

No es el motivo de este artículo explicar la metodología de la realización de la PCR y los test de anticuerpos. Desde el diagnóstico de la infección mediante la detección del virus en muestras de vías respiratorias hasta las pruebas necesarias para el correcto seguimiento, pronóstico y colaboración en la toma de decisiones terapéuticas o el conocimiento del estado de inmunización de los pacientes, el laboratorio clínico está siendo una pieza clave en el complicado puzle de esta nueva situación. Si habitualmente muchas de las decisiones clínicas están basadas en la información procedente del laboratorio clínico, este hecho se ha incrementado en la situación actual de los pacientes con COVID-19.

Pero es que, además de las pruebas diagnósticas de la PCR y serología de anticuerpos, los profesionales del laboratorio han tenido que adaptar sus instalaciones a las nuevas demandas y circunstancias para contribuir y facilitar el seguimiento clínico y asegurar la eficacia del tratamiento terapéutico aplicado.

Ante el dramatismo de ver cómo los pacientes se deterioraban ante sus ojos, los médicos solicitaban pruebas diagnósticas de todo tipo que diesen respuesta o explicaran la fisiopatología del enfermo; necesitaban datos analíticos y/o radiológicos que les ayudara para tomar decisiones terapéuticas. La incertidumbre, falta de seguridad, de confianza ha generado inquietud en la actuación médica. Han tenido que asumir y probar cualquier terapia que pudiera ser efectiva, aunque no estuviera debidamente contrastada su eficacia.

Los laboratorios de urgencia, para dar respuesta a estas inquietudes han tenido que adaptar sus instalaciones para efectuar las pruebas bioquímicas, inmunológicas y hematológicas alteradas en estos pacientes. Sirvan como ejemplo las alteraciones analíticas más solicitadas referidas en el informe de la Vocalía Nacional de Análisis Clínicos del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

— Gasometría, como en todas las neumonías. Estado ácido base arterial: los pacientes infectados pueden desarrollar de manera súbita insuficiencia respiratoria aguda, por lo que es importante tener presente las alteraciones en la gasometría arterial para poder realizar un correcto diagnóstico y tratamiento.

  El score SOFA o «Sequential Organ Failure Assessment», es utilizado frecuentemente en las unidades de cuidados críticos y se calcula en base a parámetros analíticos y clínicos.
— Linfopenia: Un recuento linfocitario bajo ($<0{,}4 \times 10^9$/L) se asoció de una manera importante al desarrollo de neumonía grave (n.º de neutrófilos/n.º de linfocitos > 3,13).
— Neutrofilia: El 87 % de los pacientes con una cifra de neutrófilos por encima de 7×10^9/L desarrollaron un peor curso clínico.
— Leucocitosis: El 96 % de los pacientes con recuento leucocitario superior a 10×10^9/L presentaron un cuadro severo.
— Dímero D: El 81 % de los pacientes con niveles de dímero D superiores a 1 mg/L presentaron un cuadro grave de neumonía, valores de mal pronóstico en el momento del ingreso. También se asoció a la aparición de complicaciones trombóticas.
— Proteína C reactiva: Mayores niveles de proteína C reactiva (> 150 mg/L) se relacionan con desarrollo de neumonía severa.
— Lactato deshidrogenasa (LDH): El 100 % de los pacientes con neumonía grave presentaron niveles por encima de 720 U/L.
— Ferritina: Niveles elevados de ferritina (> 2000 ng/mL) se relacionaron con el desarrollo de síndrome hemofagocítico (SHF).
— Procalcitonina (PCT): La procalcitonina es un marcador de utilidad para vigilar los niveles de sobreinfección bacteriana. Niveles superiores a 0,5 µg/L, corresponden a un riesgo 5 veces mayor de infección severa.
— Troponina T: Durante la hospitalización los pacientes con niveles elevados de TnT tuvieron más frecuencia de arritmias malignas que los que presentaban niveles de TnT normales.
— Interleucina-6: Niveles elevados de IL-6 (>80 pg/mL) se asocian al desarrollo de SHF y a fallo respiratorio severo.

— Péptidos natriuréticos (BNP, NT-prBNP): La elevación de péptidos natriurétricos son un factor de riesgo de muerte independiente en pacientes con COVID-19.
— Alanina aminotransferasa (ALT): El aumento de la actividad de la ALT se relacionó con peor evolución, especialmente con niveles superiores a 40 U/L.

Como venimos refiriendo en este artículo, los laboratorios de Análisis Clínico han dado respuesta a la investigación de las alteraciones fisiopatológicas de los trastornos orgánicos producidos por la pandemia COVID-19, referidas principalmente a interacciones del virus SARS-CoV-2 con el sistema renina-angiotensina-aldosterona, con el sistema inmunitario, así como con la coagulación y el sistema microvascular.

Los profesionales del laboratorio clínico han vivido con preocupación y responsabilidad esta pandemia, teniendo que adaptar sus instalaciones para la correcta organización de la demanda asistencial sanitaria. Como manifiestan los Dres. Buño (Hospital de la Paz, Madrid) y Álvaro González (Clínica Universitaria de Navarra), en la nota de prensa de la Sociedad Española de Química Clínica del 24/04/2020, han tenido que afrontar los retos demandados por la pandemia COVID-19, han debido aprender a interpretar los resultados de ciertas magnitudes en un nuevo contexto clínico como las pruebas de coagulación, con especial mención al D-dímeros, o a elaborar perfiles que ayuden a estratificar a los pacientes explorando biomarcadores de función hepática, lesión miocárdica, inflamación o infección, entre otras.

CONCLUSIONES

Como conclusión, debemos destacar que los laboratorios clínicos de urgencia y centrales han sabido responder con gran celeridad a los desafíos que ha impuesto la pandemia actual, pero también han aprendido que deben estar preparados para una nueva epidemia o pandemia. Para ello, han elaborado unas recomendaciones que sirvan de referencia a estas posibles situaciones.

— Revisar los protocolos de seguridad con el adecuado uso de los equipos de protección individual y adaptarlos a las circunstancias del laboratorio, con objeto de preservar la seguridad de los profesionales que trabajan en los laboratorios clínicos, con especial atención a los técnicos de laboratorio.
— Adecuar la organización de los servicios al cambio de actividad. Por un lado, una parte importante de la actividad habitual desapareció por la baja demanda de las necesidades médicas que no fueran COVID-19, mientras que por otro lado apareció una creciente demanda para atender a los pacientes de COVID-19. Ello ha obligado a reajustar circuitos, protocolos y plantillas.
— Compaginar esta reorganización con la ayuda profesional y logística a otras ubicaciones del hospital para múltiples tareas, entre las que destaca la organización del laboratorio clínico de los hospitales de campaña.
— Poner en marcha nuevas pruebas como la detección por PCR del virus en muestras respiratorias, medición de citocinas, como la IL-6, o readaptar la cartera de servicios en los laboratorios de urgencia para medir magnitudes que ofrezcan valor en la toma de decisiones clínicas en los pacientes con COVID-19.
— Formación en la correcta interpretación de los resultados. Sigue habiendo una auténtica explosión de publicaciones donde es importante seleccionar las más relevantes.

BIBLIOGRAFÍA

BUÑO SOTO, A. (2020), El profesional de la medicina de laboratorio ante la pandemia por COVID-19: https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/almed-2020-0032/html

GARCÍA COLLÍA, M., CARBAJAL DE LARA, K.A., ALBERT HERNÁNDEZ, M., ALL KASSAM MARTINEZ, D., GARCÍA MARTÍNEZ DE ARTOLA, D. & SALINAS, M. (2020), Actualización del diagnóstico por el laboratorio del Virus SARS-CoV-2, agente de la infección COVID-19. Farmacéuticos, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Vocalía Nacional de Farmacéuticos de Análisis Clínicos; https://www.farmaceuticos.com/farmaceuticos/farmacia/vocalias/analistas-clinicos/informes/diagnostico-por-el-laboratorio-del-virus-sars-cov-2/

GOMEZ CANGA-ARGUELLES, C. (2015), El laboratorio y la medicina: de los síntomas a los signos. Discurso de ingreso en la Real Academia de Farmacia de Cataluña. Barcelona, 22 de marzo de 2015.

IBER, P., MENEU, R., CAMPILLO ARTERO, C., HERNÁNDEZ, I., PEIRÓ, S. & ORTÜN, V. (2020), El rol de las pruebas de laboratorio en la COVID-19. Blog Economía y Salud; 14 de abril de 2020.

ORDEN SCO/3369/2006, de 9 de octubre (2006), por la que se aprueba y publica el programa formativo de la especialidad de Análisis Clínicos. BOE núm. 262, jueves 2 de noviembre de 2006, 38117.

SEQCMI (2020), Los laboratorios clínicos españoles afrontan una rápida transformación para enfrentarse al COVID-19. Nota de prensa de la Sociedad Española de Química Clínica. SEQCMI, 24.04.2020.

SEQCMI (2020), Los análisis en el laboratorio clínico, pieza clave para luchar contra la pandemia de COVID-19. Nota de prensa de la Sociedad Española de Química Clínica. SEQCMI, 14.04.2020.

Capítulo IV
Claves de la pandemia y primeras lecciones aprendidas

M. de los Ángeles Calvo Torrás
Académica Numeraria de la Real Academia de Farmacia de Catalunya, de la Real Academia de Medicina de Catalunya, de la Academia de Ciències Veterinaries de Catalunya y de la Real Academia Europea de Doctores

En este capítulo se aportan, comentarios y reflexiones basadas en la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2 y las posibles lecciones que se puedan deducir. Desde 2019, nos afecta y preocupa la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2, que ha modificado de forma prácticamente irreversible, la que definíamos como «normalidad» de nuestra manera de vivir, y que ha alterado el comportamiento y la capacidad de interrelación de los seres humanos.

Debemos destacar que de la pandemia derivan como efectos colaterales, pero no por ello menos importantes y trascendentes, problemas tan graves como el incremento del hambre en el mundo, las complicaciones relacionadas a la dificultad de vacunar de otras enfermedades, principalmente en determinados entornos, las complicaciones en la atención primaria y las consecuencias inherentes a una economía muy lábil y precaria a nivel mundial.

La pandemia ha tenido un efecto catastrófico en la economía mundial: millones de personas, han perdido sus puestos de trabajos. Este desastre económico merece el análisis de especialistas en la materia, pero hay que apuntar, que esta crisis económica es el efecto y no la causa.

El ser vulnerables nos vuelve necesitados no únicamente de bienes materiales, como la salud y la economía, sino de vínculos humanos, como la amistad, el respeto, el amor, ya que solamente otro humano puede reconocer y comprender nuestras carencias y compartir y ayudar en nuestras necesidades.

La vulnerabilidad, por tanto, presenta un aspecto positivo, ya que promueve la relación humana de empatía, solidaridad y subsidiariedad; y, al contrario, el desconocimiento de la vulnerabilidad por parte de aquellos que se presentan como invulnerables desde la perspectiva económica o del poder determinar que pueden cometer graves actos de deshumanización.

La realidad nos muestra que somos individuos frágiles, necesitados e incompletos, desvalidos ante males materiales y víctima del mal moral, ocasionado por otros, ya sea provocado o no intencionalmente.

Existir comporta riesgos, que intentamos aprender a controlar desde la infancia, pero nunca lo logramos de forma completa, como nos lo muestra la situación crítica de esta pandemia. Para minimizar los riesgos de la vulnerabilidad, debemos reconocer y aceptar su existencia y desarrollar estrategias protectoras.

Cabe destacar, sin duda, el hecho de haber tenido que adoptar medidas sanitarias, controvertidas por muchos.

Durante la primera ola de la pandemia, nos encontramos frente un gran desconocimiento y apenas evidencias científicas que indicaran como debía ser el tratamiento en los pacientes. Asimismo, hubo dificultades para establecer circuitos asistenciales apropiados tanto en hospitales como en centros de atención primaria y no disponiendo, en un inicio de las pruebas diagnósticas requeridas. La necesidad de dar una respuesta asistencial a una situación sin precedentes en nuestra sanidad hizo necesarias una serie de medidas drásticas que incluyeron fundamentalmente una redistribución y priorización de los recursos tanto humanos como materiales para tratar a los pacientes afectados por la COVID-19. Todo ello, tuvo una gran repercusión en la actividad programada y urgente de la práctica totalidad de servicios de salud de España, llegando a suspender, en algunos momentos, la actividad quirúrgica programada por completo, existiendo además

un fenómeno de disminución inicial del número de cirugías urgentes debido tanto a una menor afluencia por miedo al contagio como a un retraso de la asistencia de los pacientes a los hospitales, lo que derivó posteriormente en la necesidad de intervenir pacientes con casos más evolucionados.

Por ello, quedaron, en determinados casos, relegados a un segundo plano de atención, procesos clínicos en los momentos más álgidos de la primera ola de la pandemia, y la práctica totalidad de la atención médica y sanitaria se dirigió a los cientos de pacientes que ingresaban en los hospitales, afectados por SARS-CoV-2, en varios estadios de una enfermedad, de evolución, prácticamente desconocida.

La OMS ha desarrollado un plan de investigación que tiene como finalidad, la detección e identificación de enfermedades y patógenos que pueden ser capaces de originar una emergencia de salud pública y para las que, actualmente, no se dispone de vacunas ni de tratamientos efectivos. Este es otro reto de futuro que tenemos que considerar prioritario y más teniendo en cuenta, que voces de reconocido prestigio internacional, auguran la posibilidad de una nueva pandemia, en un período de tiempo no muy lejano. Cabe destacar que el control de los patógenos zoonóticos (transmisibles del animal al hombre y viceversa) como es el caso de los Coronavirus, y, por tanto, la protección de la salud pública debe basarse en la elaboración de estrategias mundiales de prevención y control de patógenos, coordinadas en la interfase animal-hombre-ecosistemas y aplicables a nivel mundial, regional y nacional mediante la implementación de políticas adecuadas en la línea de «una sola salud».

Otro aspecto que considerar es la disminución de las vacunaciones frente a determinados agentes etiológicos, en países con graves dificultades en el sector sanitario que han ocasionado un incremento en la casuística de procesos de etiología infecciosa en niños, fundamentalmente.

Como ya he apuntado, desde el inicio de la pandemia, la forma de vivir en nuestro planeta ha sufrido un cambio drástico, una casi instantánea transformación generada por el nuevo Coronavirus de manera directa, en nuestras vidas, y debemos ser capaces de aceptar, la falta de previsión y los errores cometidos, en gran parte por desconocimiento del virus, del que todavía nos queda mucho por evidenciar.

El mundo no será igual después de esta pandemia. Se deben analizar cómo serán estos cambios y definir con la máxima precisión los escenarios de futuro. Estamos ante riesgos que conocíamos poco y tenemos que dotarnos de nuevas herramientas para garantizar nuestra seguridad a todos los niveles.

El virus que nos afecta nos ha sorprendido a todos, básicamente, desconocíamos como era capaz de comportarse, de expandirse, su grado de capacidad infectiva, su capacidad de mutar y la amplia variedad de sintomatologías, que puede desencadenar e incluso los efectos secundarios de larga duración que manifiestan muchas personas que han superado la infección.

En consecuencia, disponer de este conocimiento es un elemento no solo básico sino estratégico. Debe abarcar, todos los datos asociados a la pandemia, desde la propia biología del virus hasta la estructura sociosanitaria de la población. Estos datos son esenciales y su control y manejo generará un nuevo tipo de conocimiento fundamental para la vida.

La pandemia actual, es una oportunidad para tomar conciencia de la importancia que las relaciones humanas tienen para nuestra vida. Una lección que debemos ser capaces de interiorizar es que no es posible disfrutar de la libertad sin responsabilidad ni solidaridad.

Es fundamental e ineludible, adoptar las medidas imprescindibles para la contención de las pandemias, considerando siempre a la salud como un bien prioritario y esencial.

Cualquier medida que se implemente, en época de crisis incide sobre los ciudadanos, sus familias, sus empresas y su economía, por ello, se debe analizar en profundidad cómo y cuándo, se decide su implantación. Es imprescindible explicar a los ciudadanos, con total transparencia y rigor, el motivo y la oportunidad de las medidas adoptadas, en cada momento.

Es fundamental evaluar los pros y contras de cada decisión, escuchando a los expertos.

Debemos remarcar que cuando se manifiesta el rebrote de una pandemia, la lectura de este es muy negativa, no solo en cuanto a la salud, sino que, también implica un efecto negativo y de inseguridad de los ciudadanos, hacia las autoridades sanitarias.

Debemos recordar que actualmente el nivel de vacunación alcanzado en el primer mundo ha determinado una menor mortalidad, aunque persiste la prevalencia de las diversas variantes del virus. Sin embargo, ante la globalización, es imprescindible que la vacunación se extienda de forma eficiente y eficaz a un elevado porcentaje de la población mundial.

También cabe destacar que, aunque la vacunación es efectiva, como se ha demostrado, no se pueden olvidar las medidas preventivas, que de forma simplificada podemos representar por tres letras **m** y una **v**, y que corresponden a:

— **m**etros o distancia entre personas,
— **m**ascarilla,
— **m**anos que debemos lavar con agua y jabón de forma sistemática, y desinfectarlas con solución hidroalcohólica,
— **v**entilación de espacios.

Estas medidas, son fundamentales para el control de la pandemia y se pueden considerar como el mejor sistema de protección ante cualquier virus, y aún más en aquellos de transmisión hombre-hombre y por vía respiratoria.

Cuando la pandemia actual esté controlada, el mundo habrá cambiado, y aunque hablamos de la vuelta a la «normalidad», será una normalidad adaptada a las nuevas necesidades. no hay duda de que la crisis que estamos viviendo se debe aprovechar como una lección para el futuro.

Los cambios de comportamiento impuestos por la pandemia han hecho que adoptemos, una forma diferente de afrontar la vida, incluso se habla de nuevos síndromes relacionados con el temor del contagio. Esta problemática a nivel de salud se extiende a todas las edades, nuestros niños y jóvenes no reaccionan igual que antes y también el nivel de reclusión en casa a que han sido sometidos repercute en las relaciones con los demás. Afecta a todos, y la voz de psiquiatras de renombre internacional evidencian un marcado incremento de enfermedades relacionadas con autoestima y capacidad de interrelación social.

Las alertas sanitarias que hemos vivido en el siglo XXI, como el SARS, el MERS, o la gripe aviar, no han llegado a tener el impacto del SARS-CoV-2. Estos hechos han determinado que no estuviéramos preparados para el impacto que ha supuesto el confinamiento del 93 % de la población mundial, según datos de las Naciones Unidas.

La situación actual, incidirá sin duda en la manera en cómo nos relacionamos en el futuro. Según los expertos, nos costará tener una proximidad fuera del entorno familiar, sentiremos una sensación de desprotección y cierto recelo a la asistencia a eventos multitudinarios.

Esta pandemia nos ha recordado que la interconexión humana tiene un efecto directo en la propagación de las enfermedades, pero debemos tener en cuenta que también es necesaria para nuestro bienestar social.

Como resultado de la experiencia que estamos viviendo, tenemos que aprender que no somos invencibles y nos debe hacer reflexionar sobre el tipo de sociedad que queremos tener.

La naturaleza humana es social y cultural, y por eso hay que contemplar la actual situación, considerando que las sociedades humanas no son una suma de individuos sino una compleja red de relaciones sociales a las que les damos sentido. sin duda, la sanidad (que no equivale exactamente a la salud) y la economía son ámbitos centrales, pero incluso para manejarse bien en ellos se necesita tomar en consideración las dimensiones sociales y culturales.

No podemos olvidar que la comunicación, para que sea realmente humana, debe ser física, presencial; no puede ser sustituida sino solo complementada por otras formas de relación parcial (sean epistolares, telefónicas o telemáticas).

Un estudio del Colegio de Psicólogos de España concluye que la pandemia ha incrementado el número de problemas psicológicos en la población. Los expertos apuntan a la depresión grave o moderada, a la ansiedad o una peor calidad de sueño como algunos de los efectos más frecuentes.

Como consecuencia de una situación tan atípica, como la que estamos todavía viviendo hace posible experimentar algunas reacciones, sensaciones o emociones, como rabia, tristeza, impotencia o angustia, desgana, y falta de ilusiones, entre otros.

El 41,2 % de los españoles duerme menos que dormía y un 36 % ha disminuido la cantidad de ejercicio físico. Dos aspectos, según los expertos, «muy importantes» de cara al bienestar psicológico de las personas.

A pesar del malestar que la pandemia está generando, la mayoría de las personas, afirman que esta experiencia les ha servido para aprender. Más del 80 % afirma que hay cosas en la vida que ahora valora más y que lo hacen sentir mejor persona.

El 30 % señala que sus relaciones personales han mejorado durante la pandemia, Pero o podemos olvidar un aspecto negativo, reflejado en el notable incremento en los delitos de género y en los robos.

La pandemia ha venido a marcar un punto y aparte en nuestras vidas. Ha modificado nuestra manera de relacionarnos y de expresar los afectos. Por ello, se perciben dos emociones básicas de manera clara: la tristeza, por todos aquellos que han sido derrotados por el Coronavirus y la incertidumbre sobre las administraciones si no nos dan una línea clara de respuesta y tenemos que elegir quien nos dice la «verdad» siendo una situación que nos genera malestar, ya que en época de crisis se necesitan voces que lideren la sociedad, palabras que alienten a las personas, claridad de pensamiento que pueda transformar el miedo y la crispación en colaboración y valentía.

La pandemia aumenta la percepción de peligro ante personas menos cercanas y seguramente por ello, en un futuro, guardaremos más las distancias, quizás los dos besos o dar la mano no lo volvemos a hacer o no tan fácilmente como hasta ahora.

Después de esta pandemia, se establecerá un nuevo orden y las medidas relacionadas con el cambio climático y la sostenibilidad adquirirán una prioridad renovada, pero no podemos olvidar que los problemas puestos de relieve por la crisis persistirán o incrementarán. Seguirá siendo necesario abordar la pobreza, la desigualdad económica aún más exacerbada, la disminución de la biodiversidad, la degradación ambiental y la escasez de agua.

Los retos de futuro que debe plantearse la humanidad deben incluir, sin duda, como proteger y ayudar a los más vulnerables.

Debemos recordar que, en tiempos de pandemia, la guerra se libra contra un enemigo común, invisible, pero real, que pone en evidencia la fragilidad y la vulnerabilidad del hombre. La crisis que estamos viviendo, presenta características nuevas y desconocidas.

Los gobiernos deben plantearse como un reto de futuro, una respuesta a nivel local, nacional e internacional totalmente coordinada, una lucha en común frente a un único enemigo.

Las decisiones deben ser muy meditadas y consensuadas, y hay que recordar que las aplicadas, en momentos de crisis pueden condicionar a la sociedad durante décadas. Es imprescindible decidir medidas económicas colectivas que permitan un correcto crecimiento económico y medidas de seguridad para el bienestar de todos.

Esta pandemia nos deja una lección que hay que recordar, sin duda, los recortes sanitarios salen caros y en consecuencia los gobiernos deben estar preparados para contingencias sanitarias, tanto en cuanto a disponer de reservas de material de protección, como de protocolos de salud pública que garanticen una mayor eficacia en la aplicación de las medidas de prevención y tratamiento.

Consideramos imprescindible que, ante una nueva posible pandemia, las autoridades sanitarias constituyan, de forma permanente, comités asesores integrados por científicos especializados en prevención, epidemiología, enfermedades infecciosas, farmacología, ética, sociología y economía. En esta línea de decisiones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunció, en Ginebra, la creación de un panel internacional de expertos para prevenir la aparición de futuras pandemias causadas por enfermedades zoonóticas. Indicando que la degradación del medio ambiente y el uso no sostenible de recursos animales podrían contribuir a las mismas. Este constituido por 24 expertos internacionales, contará con la colaboración, además de la OMS, de la Organización para la Salud Animal (OIE), el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

Entre los objetivos de este nuevo organismo estará la creación de mecanismos de alerta rápida para detectar, lo antes posible, nuevos virus en animales e impedir su salto al ser humano. También se intentará identificar los factores de riesgo que propician el paso de estos patógenos al hombre. Todavía se desconoce el origen de la actual pandemia, de SARS-CoV-2.

Durante los últimos años, enfermedades de origen animal como el SARS, el zika, la gripe A, la gripe aviar o el MERS han revelado la urgencia de aplicar un enfoque multidisciplinar en estas crisis sanitarias. Según el director general de la OMS, Tedros Adhanom Ghebreyesus, temas como los problemas medioambientales, la salud animal o la humana no pueden abordarse de forma individual.

La pandemia, desencadenada por el SARS-CoV-2, ha incidido de forma evidente en el desarrollo sostenible de nuestro planeta. Ha puesto a prueba el sistema de gestión sanitaria.

Las consecuencias son fundamentales tanto para la salud como para el resto de las políticas públicas, se necesita un sistema de gestión capaz de conciliar las recomendaciones técnicas de diferentes ámbitos y las decisiones políticas

El reto futuro al que nos enfrentamos es, sin duda, ser capaces de aportar desde todas las vertientes, los esfuerzos necesarios para remontar la situación actual y colaborar entre todos a que el mundo renazca, teniendo en cuenta las lecciones que deberíamos de haber aprendido, y en consecuencia no reincidiendo en los errores cometidos.

Si bien hay que reconocer los grandes daños que la pandemia ha ocasionado, debemos reflexionar sobre los aprendizajes que ella nos ha traído, desde el punto de vista ético y desde la perspectiva material que debe incluir:

— Desarrollo de una infraestructura suficiente en el campo de la salud.
— Inversión en ciencia que permita:
  - Monitorear patógenos.
  - Evaluar posibles nuevos brotes.
  - Estudiar nuevas vacunes.
  - Plantear nuevos tratamientos.
— Regulación y administración de los recursos económicos.
— Capacidad para colaboración internacional.
— Estructuración general de manejo epidemiológico.

Debemos estar preparados para nuevas posibles pandemias que pueden acarrear consecuencias nefastas. Es preciso recordar que, en un mundo globalizado, cualquier enfermedad infecciosa que pueda originar un brote, puede afectar, como mínimo, a los países vecinos al de inicio. En este sentido, debemos ser muy conscientes de lo que implica la globalización y en consecuencia de la facilidad de conexión de una a otra parte del planeta a través del transporte aéreo.

Actualmente, en pocas horas una enfermedad puede dar la vuelta al mundo. Por ello, es imprescindible disponer de laboratorios de diagnóstico en zonas en riesgo, así como poder contar con sanitarios especializados y epidemiólogos e informar a la población de forma correcta, para que sea capaz de aplicar con responsabilidad, las medidas de prevención adecuadas para cada caso.

Debe tenerse en cuenta que frente a la pandemia que hoy nos preocupa la prevención y la vigilancia no ha sido

suficiente, y por ello, las consecuencias, están siendo muy difíciles de controlar.

Sin duda, es imprescindible actuar de forma concreta y precisa. Actualmente, las epidemias se manifiestan cada vez, de forma más rápida y compleja y a ello contribuye, sin lugar a duda, el hecho de que las poblaciones, se concentran, sistemáticamente, alrededor de grandes urbes. Según datos de la ONU, en el año 2050, el 70 % de la población mundial será urbana. Muchas ciudades, especialmente en países en vías de desarrollo, crecen sin control y, por tanto, no disponen de una correcta previsión de servicios, incluidos los sanitarios y asistenciales. En consecuencia, parece lógico indicar que, a este ritmo de concentración urbana, alrededor de las grandes ciudades, el futuro no será fácil, y un reto indiscutible es prevenir y por tanto anticiparse a la posible transmisión de una enfermedad y sus consecuencias.

La pandemia desencadenada por el SARS-CoV-2, es sin duda un ejemplo paradigmático de la intersección entre salud, política y economía. Desde hace varios años, los expertos en salud pública han venido advirtiendo que probablemente la humanidad se enfrentaría a una grave pandemia, de origen vírico que desencadenaría graves e irreversibles problemas respiratorios e insistían en la necesidad de incrementar las medidas de prevención y el grado de preparación de los sistemas sanitarios. Frente a una predicción, aunque esté basada en evidencias científicas, los políticos, responsables de tomar las decisiones, se resisten a invertir tiempo y recursos económicos para hacer frente a lo que consideran una posibilidad abstracta de que llegue a instaurarse una crisis. Por ello, la mayoría de los países, no estaban preparados para una amenaza sanitaria global como la que se ha presentado a consecuencia de la pandemia originada por el nuevo coronavirus que afecta al hombre.

Como ha sido público y notorio, dirigentes de países como el presidente de EEUU o el primer ministro de Reino Unido, así como integrantes de la sociedad civil, se han resistido a seguir las recomendaciones indicadas por los expertos en salud pública, proponiendo una clara relajación en las restricciones y una vuelta a la normalidad, sin cumplir los calendarios de desconfinamiento o acelerando la salida del mismo, con la vuelta a la definida como «nueva normalidad», incluso antes de que los índices de infectividad fueran suficientemente bajos y mantenidos.

Sin duda, los intereses económicos han ejercido una fuerte presión y ello ha implicado, cambios en las restricciones impuestas con criterio sanitario, con el fin de lograr minimizar, las pérdidas económicas derivadas.

Nunca se debe olvidar que una pandemia exige una respuesta mundial y consensuada, ya que los virus y los agentes infecciosos en general, no respetan fronteras.

Una respuesta internacional coordinada es, sin duda, la mejor forma de hacer frente a una emergencia sanitaria internacional, como es una pandemia.

Ante una crisis sanitaria, los gobiernos deben tomar decisiones e implementar las medidas apropiadas, entre las que citaremos:

— Aplicar restricciones, en cuanto a desplazamientos en un mismo territorio o entre países, de personas, animales y mercancías, estableciendo las fases de aplicación de obligado cumplimiento y los parámetros que permitan decidir cómo y cuándo pueden flexibilizarse, sin representar un peligro para la salud y la posibilidad de nuevas olas de la pandemia.
— Adoptar decisiones sobre las inversiones a realizar con el fin de prever el control de las necesidades de la población a nivel sanitario, económico y social.
— Definir la limitación de gastos a nivel nacional con el fin de contribuir a la cooperación internacional.

Actualmente, la economía mundial se enfrenta a importantes desafíos. La rapidez y la urgencia de la intervención son tan esenciales como la necesidad de movilizar recursos a escala real. Cuando se logre controlar la pandemia actual, el mundo habrá cambiado, sin duda, y aunque hablemos del retorno a la «normalidad», será una normalidad adaptada a las nuevas necesidades. No cabe duda de que la crisis que estamos viviendo debe aprovecharse como una lección para el futuro.

Es fundamental que los gobiernos hagan un ejercicio de reflexión sobre los errores cometidos a lo largo de esta pandemia. Y en estos momentos y de cara a retos futuros es imprescindible, garantizar que las vacunas y los fármacos implicados en el tratamiento de las pandemias a escala mundial deben ser, ante todo, seguros, evaluando que su administración no implique efectos secundarios no deseados. Deben tener un costo accesible, permitiendo su adquisición a nivel mundial y en su caso, es imprescindible establecer la colaboración y la solidaridad a escala internacional. Vacunar en cualquier zona del mundo, implica prevenir la distribución de la pandemia a nivel mundial.

En otro orden de ideas, debe tenerse en cuenta que el confinamiento, al que nos ha obligado la pandemia, ha dado un valor, aún más notable a la tecnología, en aspectos tan dispares como: el teletrabajo, el consumo, la oferta, la interacción y la distribución.

El uso de la tecnología para abordar la pandemia se ha generalizado a todos los niveles. Destacan las metodologías aplicadas para la predicción y la modelización de los brotes, así como las que colaboran al rastreo de contactos entre personas positivas sintomáticos o asintomáticas y su entorno. No cabe duda de que, desde el inicio de la pandemia, y de forma casi improvisada e impuesta por

la necesidad de no disminuir la relación entre las personas y poder seguir con el trabajo, las video conferencias, las clases telemáticas y las nuevas plataformas sociales han pasado a ser la base de nuestro quehacer diario. Esta tendencia, es hoy una realidad que se ha arraigado en nuestra sociedad y que tiene visos de persistir después de la pandemia de forma habitual.

Sin duda, es fundamental adaptar y reformar los sistemas educativos y la capacitación laboral para equilibrar la oferta y la demanda de mano de obra en un mundo laboral basado en las tecnologías. Sin embargo, no podemos olvidar que no todos los trabajos pueden realizarse telemáticamente.

Finalmente, no podemos olvidar, que las pandemias al igual que los cambios climáticos, deben recordarnos, la importancia de los fenómenos naturales. Las medidas relacionadas con el cambio climático y la sostenibilidad adquieren una prioridad renovada.

Sin duda, después de esta pandemia, se establecerá un nuevo orden y otras prioridades, pero no podemos olvidar que persisten los problemas puestos de relieve por la crisis. Seguirá siendo necesario abordar la pobreza, la desigualdad económica aún más exacerbada, la disminución de la biodiversidad, la degradación ambiental y la escasez de agua.

Los retos de futuro que se debe plantear la humanidad deben incluir, sin duda, como proteger y ayudar a los más vulnerables. Debemos recordar que, en tiempos de pandemia, la guerra se libra contra un enemigo común, invisible, pero real, que pone en evidencia la fragilidad y la vulnerabilidad del hombre.

La crisis que estamos viviendo presenta características nuevas y desconocidas. Todavía no disponemos de las respuestas correctas a muchas de las cuestiones planteadas por la pandemia originada por el SARS-CoV-2: ¿qué animal es el intermediario entre el murciélago y el hombre?, ¿es estable genéticamente?, ¿se adquiere inmunidad? Y un largo etcétera. Y no podemos olvidar, que simultáneamente, estamos frente a una crisis económica, de graves consecuencias y que en gran parte deriva del confinamiento que ha tenido y tiene que ser aplicado, como medida imprescindible para lograr la contención de la pandemia.

Los gobiernos deben plantearse como un reto de futuro, una respuesta a nivel local, nacional e internacional totalmente coordinada, una lucha en común frente a un único enemigo.

En las próximas décadas, los retos a los que se enfrentará la humanidad serán probablemente una versión más compleja, si cabe, de los actuales. La crisis actual debe servir para replantear las decisiones a corto y largo plazo que inciden sobre la sanidad, la economía y la sociedad en general. Es necesario replantear los retos de futuro teniendo en cuenta la necesidad de aplicar medidas colectivas a nivel mundial.

Las decisiones deben ser muy meditadas y consensuadas, y es necesario recordar que las aplicadas, en momentos de crisis pueden condicionar a la sociedad durante décadas. Es imprescindible decidir medidas económicas colectivas que permitan un adecuado crecimiento económico y medidas de seguridad para el bienestar de todos.

La pandemia actual, que, por el momento, no hemos sido capaces de controlar, ha puesto en evidencia la falta de confianza de la sociedad en las instituciones. En este momento extraordinariamente difícil, las instituciones deben ser capaces de restablecer la confianza pública. La sociedad desea oír la voz de los expertos y en ellos deberían basarse las autoridades para establecer las medidas de seguridad y control actuales y de futuro. Las instituciones deben trabajar de manera conjunta con el fin de aportar las bases para lograr recuperar la credibilidad y lograr la confianza de la sociedad.

Frente a los retos de futuro, las autoridades, deben invertir con el fin de disponer de un sistema sanitario fuerte y, asimismo, atender las necesidades vitales de los profesionales de la salud. Es fundamental disponer de un plan de contingencia que permita prevenir las nuevas pandemias a las que con toda probabilidad deberemos enfrentarnos, en tiempos no muy lejanos.

Esta pandemia nos deja una clara lección: los recortes sanitarios salen caros y en consecuencia los gobiernos deben estar preparados para contingencias sanitarias, tanto por lo que se refiere a disponer de reservas de material de protección, como de protocolos de salud pública que garanticen una mayor eficacia en la aplicación de las medidas de prevención y tratamiento.

Consideramos imprescindible que, ante una nueva posible pandemia, las autoridades sanitarias, deben constituir de forma permanente, comités asesores integrados por científicos especializados en prevención, epidemiología, enfermedades infecciosas, farmacología, ética, sociología y economía.

La pandemia, desencadenada por el SARS-Co-2, ha incidido de forma evidente en el desarrollo sostenible de nuestro planeta. Este impacto puede tener, tanto, un efecto positivo, como es, en el caso del cambio climático, como negativo, por lo que se refiere al efecto negativo sobre la salud comunitaria y al incremento de las desigualdades sociales, como inevitable consecuencia de la desaceleración económica mundial. Actualmente, nos encontramos inmersos en una crisis económica y sanitaria que ha marcado, sin duda un punto de inflexión.

Cada gobierno ha organizado la gestión de las pandemias de acuerdo con su experiencia histórica y sus recursos. Sus modelos de gestión han partido de la misma

base sanitaria que el español, pero a medida que aumentaron la frecuencia y efectos de las pandemias, algunos gobiernos consideraron necesario crear órganos de gestión de naturaleza intergubernamental con un enfoque de seguridad nacional o reforzar el componente pandémico de los sistemas sanitarios de gestión.

Las pandemias ponen a prueba el sistema de gestión sanitaria, porque las consecuencias son fundamentales tanto para la salud como para el resto de las políticas públicas, por lo que se necesita un sistema de gestión capaz de conciliar recomendaciones técnicas de distintos ámbitos y decisiones políticas de distintos niveles. Corresponde a los gobiernos evaluar la relación coste-beneficio de las medidas que les recomiendan los sistemas de gestión pandémica internacionales o nacionales, ya que son ellos los responsables políticos de las decisiones.

El reto futuro al que nos enfrentaremos es, sin duda, ser capaces de aportar desde todas las vertientes, los esfuerzos necesarios para remontar la situación actual y colaborar entre todos a que el mundo renazca, teniendo en cuenta las lecciones que deberíamos haber aprendido, y en consecuencia no reincidiendo en los errores cometidos.

CONCLUSIONES

1. En tiempos de pandemia, la guerra se libra contra un enemigo común, invisible, pero real, que pone en evidencia la fragilidad y la vulnerabilidad del hombre.
2. La crisis actual debe servir para replantear las decisiones a corto y largo plazo que inciden sobre la sanidad, la economía y la sociedad en general.
3. La globalización determina, la ausencia de fronteras naturales y facilita sin duda, la diseminación de cualquier agente infeccioso, capaz de desencadenar una pandemia.
4. El gran reto global al que debemos ser capaces de enfrentarnos, desde el sistema sanitario, debe basarse en tres pilares fundamentales: Prevención; Flexibilidad y prudencia y Concienciación de la población.
5. Una respuesta internacional coordinada es, sin duda, la mejor forma de hacer frente a una emergencia sanitaria internacional, como es una pandemia.
6. Las instituciones deben trabajar de manera conjunta con el fin de aportar las bases para lograr recuperar la credibilidad y lograr la confianza de la sociedad.
7. Las autoridades sanitarias, deben constituir de forma permanente, comités asesores integrados por científicos especializados en prevención, epidemiología, enfermedades infecciosas, farmacología, ética, sociología y economía.
8. Debemos ser capaces de aportar desde todas las vertientes, los esfuerzos necesarios para remontar la situación actual y prevenir futuras pandemias.

BIBLIOGRAFÍA

ARTEAGA, F. (2020), La gestión de pandemias como el COVID-19 en España: ¿Enfoque de salud o de seguridad? Estudios Internacionales y estratégicos. Real Instituto Elcano. 9 pp.

BUSSE, R., MUSCAT, N.A., DE LA MATA, I. & FIGUERAS, J. (2022), Editorial. Lessons Learned from the COVID-19 Pandemic. Health Policy 126(5): 347.

CHISTENSEN, T., LAEGREID, P. & RYKKJA, L.H. (2016), Organizing for Crisis Management: Building Governance Capacity and Legitimacy. Public Administration Review 76(6): 887-897.

CVENI, T. (2023), Lessons Learned from COVID-19 to Stop Future Pandemics. Lancet 401 (10385): 1340.

DA SILVA, S.J.R., DO NASCIMENTO, J.C.F., MENDES, R.P.G., ..., KOHL, A., PARDEE, K. & PENA, L. (2022), Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. ACS Infectious Diseases 8 (9): 1758-1814.

ECDT Technical Report (2023), Lessons from the COVID-19 Pandemic, May 2023.

ESCADAFAL, C., BALDAN, R., DE VOS, M., ..., BAUSCH, D.G., VESSIÈRE, A. & SACKS, J.A. (2023), Evaluating Diagnostic Tests during Outbreaks: Challenges and Lessons Learnt from COVID-19. BMJ Global Health 8: e012506 (4 pp).

GINNEKEN, E. van, WEBB, E., MARESO, A. & CYLUSON, J. (2022), Editorial. Lesson Learned from the COVID-19 Pandemic. Health Policy 126 (5): 348-354.

HASSAN, I., FERNADES, G., MUKAIGAWRA, M. & SRIDHAR, D. (2023), Lesson from COVID-19 Must Be Learned before the Next Outbreak. Nature Medicine 29 (9): 2171-2173.

INGLET, S. (2022), Two Years of the COVID-19 Pandemic: What Lessons Have We Learned. Annals of Pharmacotherapy 56(2): 1376-1381.

MARTIN, J., TENA, N. & ASUERO, A.G. (2021), Current State of Diagnostic, Screening, and Surveillance Testing Methods for COVID-19 from an Analytical Chemistry Point of View. Microchemical Journal 167: 106305 (20 pp).

MOHAN, S.V., HEMALATHA, M., KOPPERI, H., RANJITH, I. & KUMAR, A.K. (2021), SARS-CoV-2 in Environmental Perspective: Occurrence, Persistence, Surveillance, Inactivation and Challenges. Chemical Engineering Journal 405: 126893 (21 pp).

NIGG, C., PETERSEN, E. & MacINTYRE, T. (2023), Natural Environments, Psychosocial Health, and Health Behaviours in a Crisis – A Scoping Review of the Literature in the COVID-19 Context. Journal of Environmental Phycology 88: 102009 (85 pp).

OLIVA, J., PEÑA-LONGOBARDO, L.M., GONZALEZ LÓPEZ-VALCÁRCER, B., BARBER PEREZ, P. & ZOZAYA GONZALEZ, N. (2018), Crisis económica y salud: lecciones aprendidas y recomendaciones para el futuro. Ministerio de sanidad, consumo y bienestar social. Madrid.

PEELING, R.W. & SIA, S.K. (2023), Lessons from COVID-19 for Improving Diagnostic Access in Future Pandemics. Lab Chip 23 (5): 1376 (13 pp).

RIVERA B. & CURRAIS L. (2005), La inversión en salud como gasto público productivo: un análisis de su contribución al crecimiento económico. Presupuesto y gasto público 39: 103-120.

SACH, J.D., KARIM, S.A., AKNIN, L., ..., KHANDELWAL, S., LAZAROUS, J.V. & MICHIE, S. (2022), The Lancet Commission on Lessons for the Future from the COVID-19 Pandemic. Lancet 400: 1224-1280.

STENSETH, N.C., DHARMARAJAN, G., LI, R., SHI, Z-L., YANG, R. & GARO, G.F. (2021), Lessons Learnt from the COVID-19 Pandemic. Frontiers in Public Health 9: Article 694705 (6 pp).

SURICO, P. & JALEOTTI, A. (2020), The Economics of a Pandemic: The Case of COVID-19. London Business School.

THE GLOBAL PREPAREDNESS MONITORING BOARD (GPMB) (2019), Un mundo en peligro. Informe anual sobre preparación mundial para las emergencias sanitarias, Junta de Vigilancia Mundial de la Preparación. 48 pp.

VILLALOBOS HIDALGO, J. (2019), Análisis del sistema de cuentas de salud 2017. Agathos: Atención sociosanitaria y bienestar 3: 56-63.

VV.AA. (2020), Economía política y pandemia. Fondo Monetario Internacional. Finanzas y Desarrollo. 60 pp.

Capítulo V
Veterinaria y COVID-19

M. de los Ángeles Calvo Torras
Académica Numeraria de la Real Academia de Farmacia de Catalunya, de la Real Academia de Medicina de Catalunya, de la Academia de Ciències Veterinaries de Catalunya y de la Real Academia Europea de Doctores

INTRODUCCIÓN

La figura del veterinario es clave en todos los aspectos que rodean a la salud pública, y no solo para salvaguardar la salud animal. En este estudio, se aportan comentarios relativos a la importancia de la actividad de los veterinarios y la importancia de los animales como agentes zoonóticos en el desarrollo de la pandemia.

El veterinario ha estado desde los inicios de la pandemia presente en todos los eslabones de la cadena alimentaria, «de la granja a la mesa», velando por la salud de los animales de compañía, protegiéndonos de otro tipo de enfermedades zoonóticas, investigando medidas y procedimientos que puedan atajar el virus en los múltiples centros de investigación y facultades de Veterinaria, etc.

Esta pandemia ha evidenciado, más aún, el estrecho y delicado equilibrio que existe en la triada animales-humanos-medio ambiente, base conceptual del modelo «Una Sola Salud» (*One Health*). Desde la comunicación del primer contagio en la península, la enfermedad comenzó a avanzar de forma descontrolada. Cuando fue necesaria la realización masiva de técnicas PCR para identificar los posibles positivos de forma precoz para frenar la transmisión, los laboratorios veterinarios y sus profesionales se prestaron a tal fin. Fue un trabajo muy intenso pero gratificante, porque se demostró que un centro de investigación en sanidad animal podía colaborar eficazmente en el control de la pandemia.

Con los primeros casos de contagios de COVID-19 confirmados, los laboratorios de todo el mundo comenzaron a trabajar en la búsqueda de tratamientos y vacunas efectivas. En esta línea, Joaquim Segalés, catedrático del Departamento de Sanidad y Anatomía Animal de la UAB, investigador del IRTA-CRESA y miembro del grupo de trabajo sobre modelos animales de COVID-19 de la OMS, ha participado de forma directa en la obtención de modelos animales para el ensayo de vacunas y medicamentos. Ello es debido a que los veterinarios, están especializados en el desarrollo de modelos animales.

Asimismo, Salvador Illa, Ministro de Sanidad en los inicios de la crisis sanitaria, confesó que habían recurrido, ante la falta de fabricantes de vacunas humanas a gran escala, a los fabricantes de vacunas veterinarias para poder hacer frente a una producción de las dimensiones que requería la vacuna de la COVID-19.

Por otra parte, la experiencia del veterinario en el control y erradicación de enfermedades que afectan al conjunto de la población quedó demostrada en la gestión tan eficaz de la pandemia en las Islas Feroe, llevada a cabo por el veterinario Debes Christiansen. Otro ejemplo fue Alemania, país donde el máximo responsable de la lucha contra la COVID-19 era el doctor veterinario Lothar Wieler.

En España, si bien, no desde el inicio de la crisis y no en todas las comunidades autónomas, se fueron incorporando poco a poco veterinarios a los comités de gestión.

Pero los veterinarios también han participado de forma activa en la erradicación del virus. Una de las medidas primarias de contención del SARS-CoV-2 es la desinfección, y en esa vía de actuación también quedó clara la relevancia de la Unidad Militar de Emergencia (UME), que llevo a cabo la labor de desinfección en distintos espacios críticos.

A medida que ha ido avanzando la enfermedad, los científicos han podido comprobar cómo se comporta, a quién y cómo afecta, etc., y también se han ido detectando casos de COVID-19 en diferentes especies animales. Por ello, es relevante llevar a cabo una vigilancia epidemiológica de los animales de compañía. Estos estudios son imprescindibles, ya que la presencia de anticuerpos en una mascota puede ser indicio de que el animal ha tenido contacto previo con alguna persona infectada y haya sido asintomática o no, por lo que las mascotas pueden ser consideradas como centinelas y nos pueden ayudar a un mayor estudio epidemiológico y a un diagnóstico de la enfermedad.

A pesar de haber demostrado su valía en todos y cada uno de los aspectos que una crisis como la COVID-19 conlleva, la mayoría de los veterinarios creen que no se ha valorado correctamente la figura de este profesional. La profesión veterinaria debería formar parte, sin dudarlo, del sistema de salud de cualquier país o región. Y, lamentablemente, el mundo político no ha sabido valorar la necesidad de nuestra profesión en el mundo sanitario. Debemos recordar que en España contamos con excelentes profesionales que son expertos en virus emergentes y zoonóticos. Asimismo, consideramos que el veterinario debería haber estado más presente en la cadena de control de esta enfermedad, dado que posee una notable experiencia en el control de enfermedades en poblaciones.

El papel de la Veterinaria Militar, en la prevención y control de los brotes epidémicos dentro los equipos sanitarios militares multidisciplinares, aporta una visión amplia y experimentada para hacer frente a los retos que se plantean en aquellas situaciones epidemiológicas donde el entorno de la seguridad nacional pueda estar comprometido.

El análisis de las actuaciones llevadas a cabo pone de manifiesto que la gestión ha sido fundamentalmente asistencial, sin considerar, en muchas ocasiones el enfoque «Una Sola Salud» (*One Health*).

1. SARS-COV-2: LA PANDEMIA DESDE LA VETERINARIA

Las infecciones causadas por coronavirus son definidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, antiguamente Oficina Internacional de Epizootias), como comunes tanto en animales como en el hombre. Algunas especies de Coronavirus son zoonóticas, lo que significa que pueden transmitirse entre los animales y el hombre, pero otras muchas no poseen esta capacidad.

Los primeros coronavirus se identificaron en la década de los años 60. Pertenecen a la familia Coronaviridae y se clasifican en cuatro géneros: alpha, beta, delta y gamma. Los coronavirus alpha y beta generalmente infectan a los mamíferos, mientras que los coronavirus gamma y delta mayoritariamente producen infecciones a las aves y a los peces. Cabe resaltar que el coronavirus que afecta a los perros causa diarreas, de gravedad variable, y los propios de los felinos, que desencadenan la peritonitis infecciosa felina (FIP), así como el coronavirus entérico felino (FECV), son alfa coronavirus. También se han descrito coronavirus que afectan a las aves, a los cerdos y a los rumiantes. Ninguno de estos coronavirus está asociado con el brote actual de coronavirus.

Actualmente se consideran siete coronavirus que se definen como patógenos humanos (hCo):

Cuatro virus: hCoV-229E, hCoV-NL63, hCoV-OC43 y hCoV-HKU1, que causan infecciones leves, que prácticamente infectan a todas las personas a lo largo de diversas ocasiones en la vida y que originan infecciones de tipo respiratoria y gastrointestinal y conjuntivitis.

Tres virus: SARS-CoV, MERS-CoV y el actual SARS-CoV-2, definidos como agentes etiológicos de formas graves de procesos respiratorios, que detallamos a continuación.

2. SARS-COV (SÍNDROME RESPIRATORIO AGUDO GRAVE, SARS)

El coronavirus causante del SARS (SARS-CoV), es una beta coronavirus. Fue identificado por primera vez en Cantón (China) a finales del año 2002. Un año después se registraron 8.098 casos, con una mortalidad del 9,5 %, en 24 países, y no se han identificado más casos en el mundo desde 2004. Es una infección de transmisión humana por vía respiratoria entre individuos cercanos. No se conoce el origen del virus, ni sus reservorios, aunque se han encontrado pruebas de infección en algunas civetas, mamíferos carnívoros similares a los gatos, propios del sureste asiático.

3. MERS (SÍNDROME RESPIRATORIO GRAVE DE ORIENTE MEDIO)

El coronavirus causante del MERS (MERS-CoV) es otro beta coronavirus que fue identificado por primera vez en Arabia Saudí en el año 2012. Desde entonces y hasta el mes de noviembre de 2019 se han confirmado 2.498 casos, en su mayoría diagnosticados en Arabia Saudí u otros países de la península arábiga. Los restantes casos se han registrado en 17 países y prácticamente en su totalidad estaban directamente relacionados con viajes desde la zona endémica. La mortalidad asociada a los casos ha sido del 34,5 %.

El MERS-CoV es un virus zoonótico. En su origen se aísla, probablemente en los murciélagos, aunque los dromedarios (camello arábigo) son el reservorio y fuente de

infección humana, si bien el mecanismo de transmisión no está bien definido. La transmisión interhumana es difícil y hasta ahora parece estar limitada a contactos directos y al entorno sanitario donde se atienden estos enfermos. El brote se mantiene activo, ya que el último caso notificado por Arabia Saudí se registró el día 22 de enero de 2020.

4. SARS-COV-2 (NUEVO CORONAVIRUS IDENTIFICADO EN WUHAN, CHINA)

En diciembre de 2019 se registró en la ciudad china de Wuhan un brote de una enfermedad respiratoria (neumonía) causada por un agente no identificado. La OMS recibió el primer informe sobre estos casos el 31 de diciembre. Finalmente se ha identificado que la causa es un nuevo coronavirus (denominado inicialmente como 2019-nCoV y actualmente como SARS-CoV-2).

Los primeros casos parecían estar relacionados con un mercado de marisco, pescado y animales vivos, pero posteriormente se registraron numerosos casos sin relación con este tipo de establecimientos y que evidencian la capacidad de transmisión humana. El virus también puede denominarse «el virus COVID-19» o «el virus responsable de la COVID-19». Debe tenerse en cuenta que COVID-19 se refiere a la enfermedad causada por el virus (Corona Virus Diseases 19). La ruta predominante de transmisión de SARS-CoV-2 es de humano a humano.

La evidencia actual sugiere que el virus SARS-CoV-2 surgió de una fuente animal y se están realizando investigaciones para encontrar esa fuente (incluidas las especies involucradas) y establecer el papel potencial de un reservorio animal en esta enfermedad. Sin embargo, hasta la fecha no hay suficiente evidencia científica para identificar la fuente o explicar la ruta original de transmisión de un animal al hombre, si bien se cita con insistencia la posibilidad de que el pangolín haya desempeñado un papel crucial en este proceso.

Los datos aportados sobre la secuencia genética revelan que el virus SARS-CoV-2 está muy relacionado con otros coronavirus que circulan en las poblaciones de murciélagos *Rhinolophus* y también se evalúa la posibilidad de que la transmisión a humanos involucre a un huésped intermediario.

5. LOS ANIMALES, AGENTES RESERVORIOS Y DE TRANSMISIÓN

5.1. Posible transmisión del virus SARS-CoV-2 del hombre a los animales de compañía

La pandemia desencadenada por el virus SARS-CoV-2 plantea la posibilidad de que algunos animales se infecten a través de su contacto cercano con humanos infectados. Se están realizando estudios para comprender mejor la susceptibilidad de las diferentes especies animales al virus SARS-CoV-2 y evaluar la dinámica de infección en especies animales susceptibles. La propagación actual de SARS-CoV-2 es el resultado de la transmisión de humano a humano. Hasta la fecha, no hay evidencia de que los animales de compañía propaguen la enfermedad. Por lo tanto, no hay justificación para tomar medidas contra los animales de compañía que puedan comprometer su bienestar.

Los Servicios Veterinarios de la Región Administrativa Especial de Hong Kong de la República Popular de China informaron a la OIE de que dos perros fueron infectados con el virus SARS-CoV-2 tras su exposición cercana a sus propietarios, diagnosticados de CoVD-19. La prueba, realizada por PCR en tiempo real, mostró la presencia de material genético del virus SARS-CoV-2. Los perros no mostraron ningún signo clínico de la enfermedad. Fueron puestos en cuarentena y se analizaron muestras nasales, orales, rectales y de heces. Las muestras nasales y orales resultaron positivas para SARS-CoV-2. Los perros no manifestaron signos clínicos específicos. Posteriormente, en días sucesivos, se repitieron los análisis de las muestras de heces, nasales, orales y rectales. Tanto las muestras orales como las nasales tomadas el 28 de febrero de 2020 dieron positivo. Las de los días 5 y 9 de marzo continuaron dando positivo. Todas las muestras tomadas el 12 y 13 de marzo dieron negativo. No se detectaron signos clínicos durante el período de cuarentena.

Los animales fueron devueltos a sus dueños después de completar la cuarentena y al haber obtenido resultados negativos consecutivos de la prueba. No se pudo determinar si las pruebas positivas se debían a la presencia de partículas virales intactas (infecciosas) o fragmentos de ARN (no transmiten la enfermedad) o si el perro presentaba partículas víricas por contacto con el paciente como podría tenerlas cualquier tipo de objeto.

Otro caso, en animales domésticos, se ha dado a conocer en Bélgica en dónde un paciente infectado por coronavirus lo transmitió a su gato. También se han detectado y confirmado casos en animales de un zoológico del Bronx, que fueron infectados a partir del cuidador que era asintomático. Las autoridades sanitarias insisten en que se trata de casos aislados, que no son la norma. No hay, por tanto, evidencias de que los perros y gatos jueguen un papel en la propagación de esta enfermedad humana. Las autoridades sanitarias insisten en que se trata de casos aislados, que no son la norma.

El portavoz flamenco Steven Van Gucht precisó que el felino sufrió diarrea y problemas respiratorios. «Las autoridades han decidido adoptar una serie de precauciones, ligadas a la higiene para las personas que están

infectadas y que tengan un animal de compañía», y agregó que «hoy en día no hay razón para pensar que los animales puedan ser vector de transmisión de la epidemia en nuestra sociedad». Existen medidas de gestión de riesgos para este tipo de casuística, incluida la limpieza y desinfección de las instalaciones, y una adecuada higiene y protección personal.

No hay, por tanto, evidencias de que los perros y gatos jueguen un papel en la propagación de esta enfermedad humana. Se están realizando más estudios para esclarecer si los animales pudieran verse afectados por el virus SARS-CoV-2. La OIE continuará proporcionando actualizaciones a medida que haya nueva información disponible.

Debido a que los animales y las personas pueden compartir enfermedades, a las que denominamos zoonóticas, se recomienda que las personas infectadas con SARS-CoV-2 limiten el contacto con animales de compañía y otros animales hasta que se conozca más información sobre el virus. Se aconseja que en la medida de lo posible sea otra persona quien se encargue de ellos. Si deben cuidar de su mascota, deben mantener estrictas condiciones de higiene y usar mascarilla. Esto incluye lavarse las manos antes y después de estar cerca o manipular animales, sus alimentos o suministros, así como evitar besar, lamer o compartir alimentos.

Los servicios de salud pública y veterinaria deben trabajar utilizando un enfoque de «Una sola salud» (*One Health*) para compartir información y realizar una evaluación de riesgos cuando una persona con SARS-CoV-2 informa que está en contacto con otra persona o con animales. Si bien no hay evidencia de que una infección por SARS-CoV-2 se propague de un animal a otro, mantener a los animales que dan positivo para SARS-CoV-2 lejos de los animales no expuestos es la mejor práctica.

Aunque todavía existe mucha incertidumbre sobre el origen del virus SARS-CoV-2, de acuerdo con las recomendaciones de la OMS y como precaución general, al visitar mercados de animales vivos y mercados de productos de origen animal se deben aplicar medidas generales de higiene que incluyen: lavarse las manos regularmente con agua potable y jabón después de acariciar animales o entrar en contacto con productos de origen animal, así como evitar tocarse los ojos, la nariz o la boca, y evitar el contacto con animales enfermos o productos de animales en mal estado.

Se debe evitar cualquier contacto con otros animales que posiblemente vivan en el mercado (por ejemplo, perros y gatos callejeros, roedores, pájaros, murciélagos). Se deben tomar precauciones para evitar el contacto con los desechos o fluidos animales en el suelo o las superficies de tiendas e instalaciones de mercado. Según las buenas prácticas generales de seguridad alimentaria, la carne cruda, la leche o los órganos de los animales deben manipularse con cuidado para evitar la posible contaminación cruzada con alimentos crudos. La carne de ganado sano que se prepara y sirve, de acuerdo con los principios de buena higiene y seguridad alimentaria, sigue siendo adecuada para ser consumida.

Según la información actualmente disponible, no se recomiendan restricciones comerciales de animales ni de productos de origen animal. Las precauciones para los materiales de embalaje son innecesarias más allá de la observación de la higiene básica, como garantizar que esté limpio y libre de contaminación visible. Es importante que las autoridades veterinarias se mantengan informadas y mantengan un estrecho enlace con las autoridades de salud pública y los responsables de la vida silvestre, para garantizar mensajes de comunicación de riesgos y gestión de riesgos coherentes y apropiados.

Es importante que el SARS-CoV-2 no conduzca a la adopción de medidas inapropiadas contra animales domésticos o salvajes que puedan comprometer su bienestar y salud o tener un impacto negativo en la biodiversidad. En algunos países, los servicios veterinarios nacionales apoyan las funciones básicas de la respuesta de salud pública, como la detección y prueba de muestras de vigilancia y diagnóstico de humanos. Las clínicas veterinarias, en algunos países, entre ellos España, también están apoyando la respuesta de salud pública mediante la donación de materiales esenciales como equipos de protección personal y ventiladores.

La OIE está en contacto con sus representaciones regionales y subregionales, los delegados de los países miembro y el Grupo de Trabajo sobre Vida Silvestre, así como la FAO y la OMS, para recopilar y compartir la información más reciente disponible con el fin de comprender mejor la susceptibilidad de las diferentes especies animales al virus SARS-CoV-2 y evaluar la dinámica de infección en especies animales susceptibles. El Instituto Friedrich Löffler de Alemania, especializado en la investigación de la salud animal, clasifica como improbable la transmisión del SARS-CoV-2 de los humanos a los gatos y viceversa. Todo parece indicar que tampoco supone un riesgo para la salud de los perros y otros animales como los cerdos o las gallinas, aunque se detectaran virus en la nariz y en la boca de dos perros de Hong Kong, como ya hemos indicado.

Debido a que los animales y las personas pueden compartir enfermedades, a las que denominamos zoonóticas, se recomienda que las personas infectadas con SARS-CoV-2 limiten el contacto con animales de compañía y otros animales hasta que se conozca más información sobre el virus. Se aconseja que en la medida de lo posible sea otra persona quien se encargue de ellos. Si

deben cuidar de su mascota, deben mantener estrictas condiciones de higiene y usar mascarilla.

Si bien no hay evidencia de que una infección por SARS-CoV-2 se propague de un animal a otro, mantener a los animales que dan positivo para SARS-CoV-2 lejos de los animales no expuestos es la mejor práctica. Al inducir la infección por SARS-CoV-2 en varias especies, mediante la inoculación de una dosis viral alta se evidenció en gatos y hurones, no así en perros, aves, cerdos, caballos, entre otros animales. Estos resultados permitirán comprender la gama de huéspedes del nuevo coronavirus y su patogénesis y colaborar a desarrollar modelos animales para estudios del tratamiento y prevención a partir de ensayos de fármacos y vacunas.

El día 1 de julio de 2022, se dio la noticia de que los gatos pueden excretar partículas de virus infecciosos y, así, contagiar a otros gatos. Y también sabíamos, por docenas de casos reportados durante la pandemia, que los felinos pueden infectarse por SARS-CoV-2. Sin embargo, hasta la fecha no existían evidencias de que estos pudieran transmitir el coronavirus a humanos. Ahora, casi tres años más tarde de que se notificasen los primeros casos de COVID-19, un equipo de investigadores de la Universidad Prince of Songkla, en Tailandia, ha logrado demostrar que el contagio entre gatos y humanos es posible. Su hallazgo, publicado en la revista *Emerging Infectious Diseases*, supone el primer caso reportado de este tipo.

> «Hemos proporcionado evidencia de que los gatos pueden transmitir la infección por SARS-CoV-2 a los humanos. Sin embargo, la incidencia de este método de transmisión es relativamente poco común debido a la corta duración (mediana de 5 días) en la que los gatos eliminan virus», expresan los autores en el estudio. En agosto de 2021, dos varones (padre e hijo) dieron positivo por SARS-CoV-2 y fueron trasladados a una sala de aislamiento en el hospital de Hat Yai, al sur de Tailandia. Del mismo modo, su gato de diez años también fue examinado y dio positivo.
>
> Mientras una veterinaria, equipada con máscara y guantes, pero sin gafas, tomaba muestras al gato, este estornudó en la cara de la especialista. A los tres días, la sanitaria desarrolló síntomas compatibles con COVID-19 (fiebre y tos) y dio positivo. Sin embargo, ninguno de sus contactos cercanos desarrolló la enfermedad. Al analizar genéticamente las muestras extraídas, los resultados confirmaron que la veterinaria estaba infectada con la misma variante que el gato y sus dueños, y que las secuencias genómicas virales eran las mismas.
>
> Las secuencias idénticas del genoma del SARS-CoV-2 obtenidas del paciente A (la veterinaria) y las secuencias derivadas del gato y sus 2 dueños, junto con la superposición temporal de las infecciones animal y humana, indicaron que sus infecciones estaban relacionadas epidemiológicamente. Debido a que la paciente A no tuvo reuniones previas con los pacientes B o C, probablemente adquirió el SARS-CoV-2 del gato cuando estornudó en su cara. Las secuencias del genoma eran distintas de otras secuencias que circulaban en la misma provincia, y mediante la fórmula de la distancia por pares pudimos descartar la transmisión externa», señala el estudio en sus conclusiones.

Por esta razón, los responsables del estudio aconsejan a las personas afectadas por COVID-19 «abstenerse de tener contacto con su gato». Además, recomiendan a los sanitarios la «protección ocular como parte de la protección personal estándar para los cuidadores durante las interacciones cercanas con gatos que se sospecha que están infectados».

Un estudio revela que los gatos son más propensos que los perros a coger COVID-19: así puedes evitarlo.

6. RECOMENDACIONES DE LIMPIEZA FRENTE AL CORONAVIRUS AL SACAR A PASEAR A MASCOTAS

El Colegio de Veterinarios de Barcelona publicó, unas recomendaciones básicas de limpieza y prevención que se deben aplicar, si se sacan a pasear las mascotas durante el estado de alarma. En primer lugar, debe señalarse que, en principio, ni perros ni gatos se infectan ni transmiten el SARS-Co-V-2. Tampoco se cree que los animales domésticos puedan actuar de portadores pasivos del virus; al menos de una forma relevante. No se puede descartar al 100%, pero se consideraría un fenómeno raro. Referente a los paseos, cada propietario tendrá que salir a pasear con las medidas habituales de protección que considere necesarias para su persona.

Para los animales, lo más recomendable es usar lejía a 01:50. Poner una bandeja de plástico en la entrada de casa con lejía al 1:50 (20ml de lejía corriente en 1l de agua). Cuando el perro llegue, deberá sumergir las cuatro patas en esta solución, que es viricida. No es irritante y elimina el virus al 100%. Debe tenerse en cuenta que queda mojado y mancha la ropa.

Otro producto es la solución alcohol: agua (70:30). Tiene el inconveniente de que es de difícil aplicación y puede ser irritante y tóxica si el perro se lame. También, se puede utilizar agua y jabón y lavar bien las patas al entrar en casa. Este método tiene el inconveniente de que quedan las patas mojadas y se deberán secar. Es aconsejable, para aumentar más la prevención, la limpieza de la cara y la cola, con productos habituales de la higiene animal.

7. ALIMENTOS Y SARS-COV-2

La EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) está realizando un seguimiento de la situación en relación con el brote de la enfermedad del coronavirus (COVID-19)

que está afectando a un gran número de países de todo el mundo. En la actualidad no hay pruebas de que los alimentos puedan ser una fuente o una vía de transmisión probable del virus. Las experiencias de anteriores brotes de coronavirus afines, como el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) o el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), indican que no se produjo transmisión a través del consumo de alimentos. Actualmente no hay pruebas que sugieran que el actual coronavirus sea diferente en este sentido.

El Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC) ha declarado que, si bien la fuente de la infección inicial en China fue algún animal, el virus se está propagando ahora entre las personas, especialmente al inhalar las gotitas que se producen cuando una persona tose, estornuda o exhala. Los científicos y las autoridades sanitarias de todo el mundo están realizando un seguimiento de la propagación del virus y no se ha informado de ningún caso de transmisión a través de alimentos. Este es el motivo de que la EFSA no intervenga actualmente en la respuesta a los brotes de COVID-19.

En relación con la seguridad de los alimentos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado recomendaciones para la prevención, que también incluyen asesoramiento sobre el mantenimiento de buenas prácticas higiénicas durante la preparación y la manipulación de los alimentos, entre los que destacan: lavarse las manos, cocinar bien la carne y evitar la posible contaminación cruzada entre alimentos cocinados y no cocinados.

Aunque es improbable que este virus se transmita a través de alimentos, el lavado regular de manos y las reglas de higiene para la preparación de alimentos se deben observar estrictamente al manipularlos. Estos virus son sensibles al calor, por lo que el riesgo de infección también se puede reducir por cocción de los alimentos.

Aunque todavía existe mucha incertidumbre sobre el origen del virus SARS-CoV-2, de acuerdo con las recomendaciones de la OMS, como precaución general, al visitar mercados de animales vivos y mercados de productos de origen animal se deben aplicar medidas generales de higiene, así como evitar tocarse los ojos, la nariz o la boca y evitar el contacto con animales enfermos o productos de animales en mal estado. Se deben tomar precauciones para evitar el contacto con los desechos o fluidos animales del suelo o las superficies de tiendas e instalaciones de mercado.

Según las buenas prácticas generales de seguridad alimentaria, la carne cruda, la leche o los órganos de los animales deben manipularse con cuidado para evitar la posible contaminación cruzada con alimentos crudos. La carne de ganado sano que se prepara y sirve de acuerdo con los principios de buena higiene y seguridad alimentaria siguen siendo correctos para ser consumidos. Según la información actualmente disponible no se recomiendan restricciones comerciales de animales ni de productos de origen animal.

8. LA VACUNA HIPRA COVID-19 Y SUS CARACTERÍSTICAS

Ante los tipos y pautes de administración de las vacunas, aportamos un breve resumen de la vacuna HIPRA, por ser una vacuna elaborada en España por una empresa veterinaria-farmacéutica.

Los Laboratorios HIPRA, cuentan con 50 años de experiencia en la lucha contra enfermedades transmisibles mediante el desarrollo de vacunas, es una empresa comprometida con la salud, las personas, la sociedad y el progreso. Por este motivo, ante una situación excepcional, HIPRA ha apostado por aportar su *know-how* en la lucha contra la pandemia.

El componente activo de la vacuna HIPRA COVID-19 es una proteína recombinante con estructura de heterodímero que emula el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína *Spike* (S) de las variantes Alfa y Beta del virus SARS-CoV-2. El antígeno, componente activo de la vacuna, precisa de un adyuvante que amplifique y potencie la respuesta inmunológica. En la vacuna de HIPRA contra la COVID-19 el adyuvante es una emulsión óleo-acuosa, que ya ha demostrado su eficacia y seguridad en muchas otras vacunas.

La vacuna de HIPRA se conserva entre 2 y 8 °C, lo que facilita su logística y distribución. Es una vacuna lista para usar y ser administrada por vía intramuscular.

El equipo de HIPRA está totalmente dedicado a la investigación y producción de vacunas. Los departamentos de I + D, Producción y Control de Calidad cuentan con gran experiencia en este campo.

8.1. Mecanismo de acción

La vacuna HIPRA COVID-19 es una vacuna de proteína recombinante, una tecnología utilizada en biotecnología y de la que hay mucha experiencia en vacunas ampliamente utilizadas en la población (gripe, hepatitis A o papiloma, entre otras). La vacuna de proteína recombinante consiste en fragmentos sintéticos (artificiales) de la proteína Spike del virus SARS-CoV-2 causante de la COVID-19.

En la vacunación, se introduce la vacuna en el organismo, desencadenando la respuesta inmunitaria que consiste en la producción de anticuerpos y la activación de linfocitos de memoria. Cuando la persona vacunada entre en contacto con el virus salvaje, los anticuerpos

generados por la vacuna neutralizarán el virus adhiriéndose a su proteína S, impidiendo así el desarrollo de la enfermedad.

La vacuna HIPRA COVID-19, al igual que cualquier otra vacuna, está sometida a rigurosos estudios clínicos antes de ser autorizada para su uso por las autoridades regulatorias. Estos estudios o ensayos clínicos que se clasifican en las fases I, II y III sirven para conocer la eficacia, seguridad y tolerabilidad de la vacuna. Si los resultados son satisfactorios y con garantías, las agencias pueden autorizar el uso del producto médico y el laboratorio lo puede poner a disposición de los servicios de salud.

El esquema que ha seguido HIPRA con su vacuna ha sido el siguiente:

— Fase I/IIa*. El objetivo es determinar la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna.
  * Referencia del estudio NCT05007509.
— Fase IIb*. El objetivo es determinar la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna.
  * Referencia del estudio NCT05142553.
— Fase III*. El objetivo es evaluar la seguridad y tolerabilidad de la vacuna.
  * Referencia del estudio NCT05246137.

El seguimiento de la eficacia y seguridad de las vacunas no finaliza con la autorización, una vez comercializada se llevan a cabo más estudios para confirmar que en la práctica habitual y con una perspectiva a más largo plazo, los resultados de salud son los esperados. Además, con la farmacovigilancia se sigue monitorizando el beneficio/riesgo de la vacuna de forma continua.

Detalles de los análisis clínicos efectuados con la vacuna HIPRA, comercializada con el nombre de Bimervax, pueden consultarse en Martín Sánchez *et al.* (2023). La Agencia Europea del Medicamento (AEMPS 2023; EMA 2023) recomienda su autorización el 30 de marzo de 2023. Bimervax está indicada como dosis de refuerzo (*booster*) para aquellas personas a partir de 16 años que hayan recibido la pauta de primovacunación con una vacuna de ARNm, al menos 6 meses después de la última dosis de una vacuna recibida.

BIBLIOGRAFÍA

AEMPS (2023), La EMA recomienda la autorización de la vacuna española de Hipra frente a la COVID-19, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, Ministerio de Sanidad; https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/laAEMPS/2023/docs/NI-AEMPS-09-2023-HIPRA.pdf

ALBERTO-ORLANDO, S., CALDERON, J.L., LEON-SOSA, A., ..., ZUÑIGA-VELARDE, J.J., TELLO-CABRERA, C., GARCIA-BEREGUIAIN, M.A. (2022), SARS-CoV-2 Transmission from Infected Owner to Household Dogs and Cats Is Associated with Food Sharing. International Journal of Infectious Diseases 122: 295-299.

APHIS, USDA (2020), APHIS | USDA Statement on the Confirmation of COVID-19 in a Tiger in New York. United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service; https://www.aphis.usda.gov/aphis/newsroom/news/sa_by_date/sa-2020/ny-zoo-covid-19

AVMD (2020), SARS-CoV-2 in Animals. American Veterinary Medical Association; https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/covid-19/sars-cov-2-animals-including-pets

BARBOSA, A.B. de S., KMETIUK, L.B., CARVALHO, O.V. de, ..., HUERGO, L., DOS SANTOS, A.P. & BIONDO, A.W. (2022), Infection of SARS-CoV-2 in Domestic Dogs Associated with Owner Viral Load. Research in Veterinary Science 153: 61-65.

CABRERA, A., GONZALEZ-ALVAREZ, D., UPEGUI, S., GUTIERREZ, A.L., POSADAS, S. & FORERO, D.A. (2022), Current Evidence about the Role of Animals in the Transmission of SARS-CoV-2: Implications for Public Health. Revista Lasallista de Investigación 19 (1): 135-151.

CDCP (2020), Why It Matters: The Pandemic Threat [Internet]. Global Health Protection and Security; https://www.cdc.gov/globalhealth/healthprotection/fieldupdates/winter-2017/why-it-matters.html

CHEN, W., YAN, M., YANG, L., DING, B., HE, B., WANG, Y. *et al.* (2005), SARS-Associated Coronavirus Transmitted from Human to Pig. Emerging Infectious Diseases 11(3): 446-448.

CHRISTOPHER, B. (2015), WHO Publishes List of Top Emerging Diseases Likely to Cause Major Epidemics; http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-emerging-diseases/en/

COMISIÓN EUROPEA (2020), Estrategia de la granja a la mesa; https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:52020DC0381&from=ES

CUI, X., WANG, Y., ZHAI, J., XUE, M., ZHENG, C. & YU, L. (2023), Future Trajectory of SARS-CoV-2: Constant Spillover Back and Forth between Humans and Animals. Virus Research 328: 19075 (8 pp).

DAMAS, J., HUGHES, G.M., KEOUGH, K.C., PAINTER, C.A., PERSKY, N.S., CORBO, M. *et al.* (2020), Broad Host Range of SARS-CoV-2 Predicted by Comparative and Structural Analysis of ACE2 in Vertebrates. PNAS 117(36): 22311-22322.

DUNOWSKA, M. (2023), Cross-Species Transmission of Coronaviruses with a Focus on Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection in Animals: A Review for the Veterinary Practitioner. New Zealand Veterinary Journal 71(4): 159-171.

EMA (European Medicines Agency) (2023), EMA Recommends Approval of Bimervax as a COVID-19 Booster Vaccine; https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-approval-bimervax-covid-19-booster-vaccine

EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHW) (2023), SARS-CoV-2 in Animals: Susceptibility of Animal Species, Risk for Animal and Public Health, Monitoring, Prevention and Control. EFSA Journal 21(2): 7822 (108 pp).

FERRI, M. & LLOYD-EVANS, M. (2021), The Contribution of Veterinary Public Health to the Management of COVID-19 Pandemic from a One Health Perspective. One Health 12: 100230 (10 pp).

IDEXX. Leading Veterinary Diagnostic Company Sees (2020), No COVID-19 Cases in Pets; https://www.idexx.com/en/about-idexx/news/no-covid-19-cases-pets/

KUMAR, D., BAYRY, J. & HEDGE, N.R. (2022), COVID-19: A Veterinary and One Health Perspective. Journal of Indian Institute of Science 10(2): 689-709.

LABORATORIOS HIPRA (2020), La vacuna HIPRA COVID-19 y sus características; https://www.hipracovid19.com/es/covid-19-estamos-investigando-una-nueva-vacuna-frente-coronavirus

LACONI, A., SARACINO, B., FATTORINI, E., PELLEGRINI, G., BUCCHI, M., BAILONI, L. & PICCIRILLO, A. (2023), SARS-CoV-2 and Companion Animals: Sources of Information and Communication Campaign during the COVID-19 Pandemic in Italy. Veterinary Science 10: 426 (18 pp).

LAM, T.T-Y., JIA, N., ZHANG, Y.-W., SHUM, M.H.-H., JIANG, J.-F., ZHU, H.-C. *et al.* (2020), Identifying SARS-CoV-2-Related Coronaviruses in Malayan Pangolins. Nature 583 (7815): 282-285.

LAN, J., GE, J., YU, J., SHAN, S., ZHOU, H., FAN, S. *et al.* (2020), Structure of the SARS CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain Bound to the ACE2 Receptor. Nature 581(7807): 215-220.

LECU, A., BERTELSEN, M.F. & WALZER, C. (2020), Science-Based Facts & Knowledge about Wild Animals, Zoos and SARS-CoV-2 Virus. European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians-Transmissible Diseases Handbook; https://cdn.ymaws.com/www.eazwv.org/resource/resmgr/files/transmissible_diseases_handbook/5th_ed_transmissible_diseases_handbook/chapters/covid19_faq_v6.1_28_april_20.pdf

LIEW, A.Y., CARPENTER, A., MOORE, T.A., ..., BURRELL, S.D., GHAI, R.R. & BEHRAVESH, C.B. (2023), Clinical and Epidemiologic Features of SARS-CoV-2 in Dogs and Cats Compiled through National Surveillance in the United States. Journal of American Veterinary Medical Association 261(4): 480-489.

LORIA, K. (2017), Bill Gates Warns a New Disease Could Kill 30 Million People in 6 Months, and We're Not Ready. ScienceAlert; https://www.sciencealert.com/bill-gates-warns-a-new-disease-could-kill-30-million-people-in-6-months

LU, G., WANG, Q. & GAO, G.F. (2015), Bat-to-Human: Spike Features Determining «Host Jump» of Coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and beyond. Trends in Microbiology 23(8): 468-478.

MADHUSOODANAN, J. (2022), Animal Reservoirs – Where the Next SARS-CoV-2 Variant Could Arise. JAMA 328 (8): 696-698.

MARTIN SÁNCHEZ, F., MARTÍNEZ-SELLÉS, M., MOLERO GARCÍA, J.M., ..., GONZÁLEZ DEL CASTILLO, J., MARTÍN-DELGADO, M.C. & BOUZA, E. (2023), Insights for COVID-19 in 2023. Revista Española de Quimioterapia 36(2): 114-124.

MELPING, G., YUN, G. & ZHAOYI, P. (2020), Off the Shelves in Beijing, Is Salmon Guilty of Spreading Coronavirus? CGTN; https://news.cgtn.com/news/2020-06-14/Off-the-shelves-in-Beijing-is-salmon-guilty-of-spreading-coronavirus--Rj33sh4b8Q/index.html

MURPHY, H., SANCHEZ, S., AHMED, S., ..., HEINRICH, D., LIANG, Y. & LY, H. (2022), SARS-CoV-2 in Companion Animals: Do Levels of SARS-CoV-2 Seroconversion in Pets Correlate with Those of Pet's Owners and with Protection against Subsequent SARS-CoV-2 Infection? Virulence 13(1): 1216-1220.

OIE (2020), Questions and Answers on the COVID-19. World Organisation for Animal Health; https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-Recommendations/questions-and-answers-on-2019novel-coronavirus/

OIE (2020), OIE World Animal Health Information System. Weekly Disease Information; https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI/index/newlang/en

OMS (2019), JUNTA DE VIGILANCIA MUNDIAL DE LA PREPARACIÓN. Un mundo en peligro: informe anual sobre preparación mundial para las emergencias sanitarias. Organización Mundial de la Salud; https://apps.who.int/gpmb/annual_report.html

REGGIANI, A., RUGNA, G. & BONILAURI, P. (2022), SARS-CoV-2 and Animals, a Long Story that Doesn't Have to End Now: What We Need to Learn from the Emergence of the Omicron Variant. Frontiers in Veterinary Science 9: 1085613 (8 pp).

SCICOM (2020), Zoönotisch risico van het SARS-CoV 2 virus (COVID-19) bij gezelschapsdieren: infectie van dier naar mens en van mens naar dier; https://pureportal.ilvo.be/en/publications/advies-4-2020-zoönotisch-risico-van-het-sars-cov2-virus-covid-19-

SHANG, J., YE, G., SHI, K., WAN, Y., LUO, C., AIHARA, H. *et al.* (2020) Structural Basis of Receptor Recognition by SARS-CoV-2. Nature 581(7807): 221-224.

SHARUN, K., DHAMA, K., PAWDE, A.M., ..., DE LA FUENTE, J., MICHALAK, I. & ATTIA, Y.A. (2021), SARS-CoV-2 in Animals: Potential for Unknown Reservoir Hosts and Public Health Implications. Veterinary Quarterly 41(1): 181-201.

SHI, J., WEN, Z., ZHONG, G., YANG, H., WANG, C., HUANG, B. *et al.* (2020), Susceptibility of Ferrets, Cats, Dogs, and Other Domesticated Animals to SARS-Coronavirus 2. Science 368 (6494): 1016-1020.

SUN, J., HE, W.-T., WANG, L., LAI, A., JI, X., ZHAI, X. *et al.* (2020), COVID-19: Epidemiology, Evolution, and Cross-Disciplinary Perspectives. Trends in Molecular Medicine 26(5): 483-495.

TAYLOR, L.H., LATHAM, S.M. & WOOLHOUSE, M.E. (2001), Risk Factors for Human Disease Emergence. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences 356 (1411): 983-989.

TIWARI, R., DHAMA, K., SHARUM, K., ..., SAH, R., BONILLA-ALDANA, D.K. & RODRÍGUEZ-MORALES, A.J. (2020), COVID-19: Animals, Veterinary and Zoonotic Links. Veterinary Quarterly 40(1): 169-182.

VALENCAK, T.G., CSISZAR, A., SZALAI, G., ..., FASEKAS-PONGOR, V., PAPP, M. & UNGVARI, Z. (2021), Animal Reservoirs of SARS-CoV-2: Calculable COVID-19 Risk for Older Adults from Animal to Human Transmission. GeroScience 43: 2305-2320.

WAN, Y., SHANG, J., GRAHAM, R., BARIC, R.S. & LI, F. (2020), Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: An Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. Journal of Virology 94(7): e00127-20 (9 pp).

WOO, P.C.Y., LAU, S.K.P., LAM, C.S.F., LAU, C.C.Y., TSANG, A.K.L., LAU, J.H.N. *et al.* (2012), Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. Journal of Virology 86(7): 3995: 4008.

Capítulo VI
Precisión terminológica y creación léxica. A propósito de la pandemia coronavírica

Yolanda Congosto Martín
Universidad de Sevilla

INTRODUCCIÓN

La lengua es un sistema de comunicación que se adapta a la evolución social; de ahí que varíe en consonancia con la realidad extralingüística a la que alude, al unísono que el mundo que le rodea, en continuo cambio y evolución, ajustándose a las necesidades expresivas de sus hablantes. En esta ocasión, es la enfermedad infecciosa causada por el SARS-CoV-2 la que acapara nuestra atención, no solo por el impacto que esta ha tenido a nivel mundial, sino también por los efectos que de ella se han derivado en todos los órdenes de la vida: sanitario, económico, político, social y también lingüístico.

Dicho esto, serán los aspectos relacionados con el lenguaje los que abordaremos en este capítulo. La intención no es otra que recoger y sistematizar la información difundida al respecto y los argumentos esgrimidos en diversos medios y justificarlos desde un punto de vista normativo, para que el lector comprenda el porqué de cada voz y de cada uso.

Para ello, nos nutriremos de fuentes académicas de carácter científico, como son la FundéuRAE, Enclave de Ciencia (RAE/FECYT), el *Diccionario de la lengua española* (*DLE*), el *Diccionario panhispánico de dudas* (*DPD*), el *Diccionario histórico de la lengua española* (*DHLE*) o la *Ortografía* (RAE/ASALE); de estudios específicos como el publicado por Paredes García y Sánchez-Prieto Borja (2021) sobre «Lengua y discurso en torno a la COVID-19»; y de las notas de prensa y artículos que profesionales como Fernando Navarro[1], médico especialista en farmacología clínica y experto en traducción médica, han difundido en revistas especializadas y en páginas web: Agencia SINC. La Ciencia es noticia; EFE: Salud; Diario Médico, Tremédica (Asociación Internacional de Traductores y Redactores de Medicina y Ciencias Afines), etc. En definitiva, de toda la información que hemos podido recabar sobre ella.

Nos centraremos, pues, en el tema de la innovación léxica y en los distintos procesos de creación de nuevas voces, afrontando todas aquellas cuestiones que afectan no solo a la lexicología y a la semántica, sino también a la morfología, la sintaxis y la ortografía.

1. LENGUAJE ESPECIALIZADO Y LENGUAJE COMÚN

Desde la incorporación del estructuralismo (principios del siglo XX) como corriente teórico-metodológica a los estudios de los hechos del lenguaje, las lenguas se conciben como sistemas organizados de signos, con base en una serie de dualidades (significante/significado; lengua/habla; sincronía/diacronía; relación sintagmática/paradigmática; lingüística interna/externa). Dichos principios afectan, por tanto, a la semántica, al mundo del significado (semántica estructural), estableciéndose así la dicotomía entre léxico *ordinario* y léxico *terminológico* o, dicho con otras palabras, entre *palabras comunes* y *términos* (técnicos o científicos). Sin embargo, en la práctica, tales delimitaciones no son tan tajantes como *a priori* pudieran parecer, ya que, en realidad, el léxico de especialidad también se nutre del lenguaje común, adaptándolo a las nuevas realidades y redefiniéndolo, por lo que no puede subsistir el uno sin el otro. Es lo que, sin

1. Agradezco desde aquí personalmente a dicho investigador sus magníficas y esclarecedoras aportaciones, que tanto nos han ayudado a entender la materia.

ir más lejos, ha ocurrido por ejemplo con la voz **cribado**, que más allá de significar: 1. «Dicho del carbón: Escogido en trozos de un tamaño reglamentario superior a 45 mm», 2. «Acción y efecto de cribar», es decir, «pasar una semilla, un mineral u otra materia por la criba para separar las partes menudas de las gruesas o para eliminar las impurezas», ha desarrollado en el ámbito científico-técnico de la medicina las siguientes acepciones: 3. m. *Med*. Examen médico efectuado a una persona para detectar una o varias enfermedades. 4. m. *Med*. Examen médico efectuado a un conjunto de personas para determinar la frecuencia de una enfermedad[2].

Así pues, parece justo comenzar este apartado intentando definir ambas esferas, la relativa al lenguaje común y la propia del lenguaje especializado, con el ánimo de arrojar algo de luz sobre cuestiones tan complejas como: ¿qué diferencias hay entre una y otra?, ¿en qué consisten dichas diferencias?, ¿qué se entiende por léxico usual y qué por léxico técnico o especializado?, ¿cómo los elementos se transfieren de una esfera a la otra? y ¿cuánto léxico comparten? Todo ello aplicado, claro está, a la pandemia coronavírica.

Como bien apunta Ávila Martín (2011), siguiendo a Martí Sánchez (2004: 171), a propósito de otro de los ámbitos especializados, el jurídico, la diferencia entre el léxico usual y el léxico técnico responde a una cuestión de categorización, pues «las unidades léxicas ordinarias codifican el conocimiento espontáneo, que se debe a las lenguas, mientras que los términos surgen del conocimiento reflexivo de las cosas y exige que su aparición vaya acompañada de una definición». Para Eugenio Coseriu, uno de los más importantes teóricos del lenguaje del siglo XX,

> En realidad, los significados de la terminología se conocen en la medida en que se conocen las ciencias y las técnicas a las que corresponden y no en la medida en que se conoce la lengua: ellos pertenecen a universos de discurso determinados y solo pueden ser definidos en relación con esos universos de discurso (Coseriu 1977: 98).

Es por ello por lo que hablar de *términos* nos remite a toda una ciencia terminológica:

> La Terminología se encarga, en definitiva, de la recogida, registro, acuñación, evaluación, normalización y difusión de todos los términos que son comunes al mismo dominio temático, a un campo del saber específico. El fin es conseguir una comunicación perfecta e inequívoca entre los especialistas o profesionales de todo el mundo. Para poder establecer una intercomunicación correcta es preciso buscar equivalencias idiomáticas que sean lo más rigurosas y exactas posibles. Algunas de las características más significativas de las terminologías científicas son: universalidad, univocidad y carácter verificable[3]. Las terminologías han de tener un carácter internacional[4] y hacer referencia solo a una sustancia que sea exacta en todas las comunidades lingüísticas[5], estando reducida al mundo de los especialistas que, a su vez, son los usuarios. Los términos que conforman las terminologías deben ser unívocos, es decir, a cada palabra debe corresponder un solo significado, convirtiéndose de esta manera la monosemia en un rasgo fundamental, de lo contrario, la multiplicidad de acepciones significativas de una misma palabra provocaría confusión y ambigüedad y daría lugar a interpretaciones erróneas. Ambas características (la universalidad y la univocidad) facilitan la traducción «a otra lengua sin residuo», tal y como afirma R. Trujillo[6]. Respecto a la última característica mencionada, podemos señalar brevemente, teniendo en cuenta las afirmaciones realizadas por E. Coseriu[7], que se trata de términos motivados basados en las clasificaciones objetivas, en la realidad extralingüística, por lo que carecen de valor lingüístico puesto que los significantes están en relación con las cosas u objetos reales, es decir, están fundados en elementos ya existentes[8] (Noya Gallardo 1995: 591).

En efecto, *universalidad*, *univocidad* y carácter *verificable* son tres características básicas del lenguaje de especialidad. Sin embargo, no siempre son respetadas y a menudo son traicionadas, entre otras razones, por fenómenos semánticos tales como la sinonimia o la polisemia, que tergiversan el sentido exacto del término y la comprensión de un lenguaje ya de por sí complejo, y en muchas ocasiones solo reconocible por el contexto lingüístico o por la presencia de estructuras sintagmáticas que restringen y delimitan su significado, como ocurre, por ejemplo, con las unidades terminológicas del tipo *test*[9], *test* de antígenos[10] y *test* de anticuerpos[11], que

2. *Cf. DLE*, *s. v.*

3. *Cf.* P. Servien: *Le langage des sciences*, Paris, 1938, así como R. Trujillo: «El lenguaje de la técnica», en *Doce ensayos sobre el lenguaje*, Madrid, 1974, 203 [así citado en el original].
4. *Cf.* S. Gili Gaya: «El lenguaje de la ciencia y de la técnica», en *Presente y futuro de la lengua española*, vol. 2, Madrid, 1964, 271 [así citado en el original].
5. *Cf.* R. Trujillo, *op. cit.*, p. 203 [así citado en el original].
6. *Ibid.* p. 210 [así citado en el original].
7. E. Coseriu: *Principios de semántica estructural*, Madrid, 1977, 96 [así citado en el original].
8. *Cf.* B. Rodríguez Díez: «Lo especifico de los lenguajes científico-técnicos», en *Archivum* XXVII-XXVIII, p. 521, afirma lo siguiente: «Su desarrollo y evolución es *a priori* de su uso como lenguajes» [así citado en el original).
9. *Cf.* Navarro (1997: 18). test. Evítese el anglicismo «test» (ya admitido por la RAE en 1992), que puede traducirse, según el contexto, por *prueba, examen, análisis, experimento, determinación* o *ensayo*.
10. Las pruebas de antígenos sirven para detectar una infección activa, puesto que identifican la presencia de proteínas del virus. La muestra se procesa en el mismo lugar de su recogida y puede tardar pocos minutos. Un resultado positivo significa que el virus está presente y probablemente existe una infección en curso (https://www.aemps.gob.es/).
11. Las pruebas serológicas o de anticuerpos detectan diferentes tipos de anticuerpos específicos frente al virus. Es decir, no detectan la presencia del virus, sino la respuesta inmunológica del individuo (https://www.aemps.gob.es/).

tantos quebraderos de cabeza han provocado en la población, entre otras razones por carecer esta de los conocimientos necesarios y desconocer la organización conceptual del término.

De ahí que Martí Sánchez (2004: 170-171) puntualice que

> la unidad terminológica, la propia de las lenguas especiales, se diferencia de la unidad léxica ordinaria en su vertiente sociopragmática[12] y en la naturaleza de su representación[13] [...]. Desde la vertiente sociopragmática, las unidades terminológicas se marcan por las actitudes que suscita su reconocimiento social, así como por los fines que guían la comunicación especializada propia de las ciencias, de sus técnicas y de las instituciones [...]. Consecuentemente, con todo ello, las estructuraciones a las que dan lugar las terminologías superan los límites de una lengua y han de aprenderse, no adquirirse, como si de una segunda lengua se tratara.

En este sentido, es imposible no reconocer la relevancia que determinados términos médicos han cobrado socialmente como consecuencia de la pandemia coronavírica. Solo hay que ver y valorar cómo el hablante, la ciudadanía en general, aún sin ser especialista en la materia, ha dado entrada en su vocabulario y asimilado términos que le eran totalmente ajenos, superando a veces las barreras del uso y abuso que los medios de comunicación han hecho de dicha terminología especializada, hasta aprehenderlos e integrarlos en su hablar cotidiano.

2. PRÉSTAMOS, CALCOS Y FALSOS AMIGOS

Otro aspecto importante que hay que destacar del lenguaje especializado de la medicina es la alta presencia de *anglicismos*. No es algo exclusivo de esta disciplina. El hecho de que sea el inglés el idioma utilizado por antonomasia en la difusión de los avances científicos y técnicos conlleva que las lenguas se vean afectadas por lo que denominamos *extranjerismos, préstamos*, *calcos* lingüísticos o semánticos y *falsos amigos*[14]; fenómenos todos ellos consustanciales a cualquier lengua viva que emergen como consecuencia de un cambio de la realidad o de la percepción que el hablante tiene de esta. Guerrero-Ramos (2013: 118), sintetiza en pocas líneas cómo

> ante las nuevas realidades de cada día, la lengua solo tiene una salida: incorporar un elemento léxico en su sistema que dé cuenta de cada concepto, bien mediante la creación de un nuevo término (neologismo formal), bien mediante la adopción o adaptación de una forma extranjera (préstamo) o bien mediante la aplicación significativa de dicho concepto a una forma ya existente (neologismo semántico), conceptos que encierra el término *neologismo*, que encontramos bien delimitados en el *Diccionario de lingüística* de Dubois cuando lo define por una parte como «toda palabra de creación reciente o recientemente tomada de otra lengua» y por otra como «toda acepción nueva de una palabra ya antigua».

Es por ello por lo que, entendiendo, pues, el préstamo lingüístico como una forma más de neología, conviene ahora diferenciar entre lo que se entiende por préstamos *de necesidad* o denotativos, que son aquellos que sirven para designar productos y conceptos nacidos en un país extranjero, y los denominados préstamos *de lujo* o connotativos, que son aquellos causados por un mimetismo lingüístico, desarrollado por el prestigio ejercido por un cierto tipo de civilización y de cultura (ídem: 122), pero considerados superfluos o innecesarios por tener la lengua receptora una denominación equivalente.

A lo manifestado cabe añadir que, una vez adoptado el préstamo, se pueden seguir dos criterios: mantener la grafía y la pronunciación originaria o adaptar tanto una como otra a las normas del sistema lingüístico de la lengua receptora, en este caso el español (nos referimos a los rasgos gráficos y morfológicos propios de nuestro idioma)[15], que es lo recomendado por la Academia, así como evitar aquellos préstamos que pudieran ser entendidos como innecesarios.

Fernando Navarro, médico de formación y traductor médico desde hace más de treinta años, al que ya hemos hecho referencia como especialista, ha trabajado incesantemente en este tema y ha escrito numerosas obras y artículos científicos: en 1997 se publicó su obra *Traducción y lenguaje en medicina*; es autor del *Diccionario de*

12. Se entiende por *sociopragmática* aquella disciplina que permite dar cuenta del fenómeno de la lengua en un contexto sociocultural [esta aclaración es nuestra; no consta en la cita original].

13. Existen otras posibles marcas del léxico terminológico (sintácticas y presentativas), pero de menor entidad (Allan 2001: 172). Así citado en el original.

14. Extranjerismo. 2. m. *Ling*. Préstamo, especialmente el no adaptado (*DLE*, *s. v.*).
Préstamo. 4. m. *Ling*. Elemento, generalmente léxico, que una lengua toma de otra (*DLE*, *s. v.*).
Calco lingüístico. Préstamo de otra lengua a modo de traducción literal o como copia de la estructura de una palabra o expresión. Calco semántico. 1. m. *Ling*. Adopción de un significado extranjero para una palabra ya existente en una lengua; p. ej., *ratón*, en su acepción «aparato manual conectado a una computadora», es calco semántico del inglés *mouse* (*DLE*, *s. v.*).
Falso amigo. 1. m. *Ling*. Cada una de las dos palabras que, perteneciendo a dos lenguas diferentes, se asemejan mucho en la forma, pero difieren en el significado, y pueden dar lugar a errores de traducción; p. ej., inglés *actually* «efectivamente» y español *actualmente*. (*DLE s. v. amigo*).

15. Para más información véase lo que la RAE y la ASALE puntualizan al respecto en la *Nueva gramática de la lengua española. Manual* (2010) y en la *Ortografía de la lengua española* (2010).

dudas y dificultades de traducción del inglés médico[16]; y entre los años 2004 y 2011 desempeñó la coordinación técnica del *Diccionario de términos médicos* de la Real Academia Nacional de Medicina (RANM 2011)[17]. En su artículo «La COVID-19 y el lenguaje médico» (2020: 790-791) nos muestra cómo con la pandemia las publicaciones científicas en lengua inglesa arrojaban un sinfín de nuevos anglicismos que los profesionales debían conocer y dominar rápidamente:

> De virología, por supuesto: ***bat coronavirus RaTG13, corona replication, Coronaviridae, nCoV, nucleocapsid, orthocoronavirus, viral shedding, virucidal***...; pero también de biología molecular (***ACE2 receptor, genomic RNA, non-structural protein 2, N-terminal domain, spike protein, splicing***), de epidemiología (***cluster, epi curve, incident case, lockdown, mitigation phase, outbreak hotspot, PUI, reproductive ratio, SEIS model***), de laboratorio de análisis microbiológicos (***drive-through testing, next-generation sequencing, nose swab, POC assays, thermal cycler***), de neumología (***acute respiratory disease, CPAP, nasal prongs, PaO2, supine ventilation, supplemental oxygen, ventilator weaning***), de material y elementos de protección (***barrier mask, biosafety level, booties, eye shield, FFP2 respirator, goggles, long-sleeved gown, PPE***).

Términos, muchas veces mal utilizados o mal traducidos por los distintos medios de comunicación, como consecuencia de una mala interpretación o de un desconocimiento profundo de la materia. De todo ello trataremos en las páginas que siguen.

3. PROCEDIMIENTOS DE CREACIÓN NEOLÓGICA

En función de todo lo expuesto, podemos recapitular diciendo que, bien en el lenguaje común, bien en el léxico especializado, los usuarios del idioma pueden decantarse por innovar y crear nuevos términos, por ampliar el significado de alguno ya existente o por adoptar un término procedente de otra lengua. En definitiva, sea cual sea la decisión que tomen, a lo que se enfrentan es a un proceso de creación neológica. Sin ir más lejos, en concreto, en la nueva actualización del *DLE* de 2021 hay 3836 modificaciones, que incluyen nuevos términos, enmiendas y acepciones[18].

3.1. Neologismos formales

Pues bien, en el caso de decidirse por un neologismo formal, es decir, por la creación de una nueva unidad léxica, el hablante se servirá de los recursos lingüísticos que su lengua le ofrece y escogerá, de entre todos ellos, aquel que considere más adecuado a sus intereses y circunstancias.

Desde un punto de vista morfológico, tres son los procedimientos de formación de palabras posibles en español: la *derivación*, la *composición* y la *parasíntesis*. El primero de ellos consiste en formar nuevas palabras mediante la adición de afijos (sean *sufijos* o *prefijos*) al morfema nuclear o *lexema*. Los prefijos no cambian la clase de palabra y se colocan antes del lexema; los hay negativos, locativos, temporales, intensificadores y cuantitativos. Por su parte, dentro de los sufijos, hay que diferenciar entre los denominados *apreciativos* (afectivos, valorativos o expresivos), que no cambian la categoría gramatical de la palabra a la que se añaden y aportan la afectividad del hablante –diminutivos, aumentativos, despectivos o peyorativos y superlativos– y los *no apreciativos*, que sí pueden cambiar la categoría gramatical de la base léxica y que alteran significativamente el significado del morfema léxico o lexema, dando lugar a procedimientos de *nominalización* (creación de sustantivos), *adjetivización* (creación de adjetivos), *verbalización* (creación de verbos) y *adverbialización* (creación de adverbios); tanto unos como otros van pospuestos al lexema y en ocasiones conectados por los *interfijos*, elementos de ilación del lexema con el sufijo correspondiente. El segundo, la composición, surge de la combinación de lexemas ya existentes en la lengua. Desde el punto de vista ortográfico y fonético ambos elementos pueden estar sólidamente unidos y presentar distintas estructuras, en función de la categoría de las palabras que sirven de base (sustantivos, adjetivos, verbos, adverbios) y de la categoría de la palabra resultante; las combinaciones posibles son[19] N + N, N + Adj., Adj. + N, V + N, N + V, V + V, V + Adv., Adv. + V, Adj. + Adj., Adv. + Adj.), aunque también pueden ir separados (con o sin guion) conformando una unidad sintagmática. El tercero, la parasíntesis, es un caso especial de composición y derivación o de intervención simultánea de prefijación y sufijación.

Si, por el contrario, abandonamos hasta cierto punto el ámbito de la morfología para hacer mayor hincapié en el de la sintaxis y la combinación de palabras, accederemos a otros posibles procedimientos de creación léxica, aquellos que forman parte del universo fraseológico; de las llamadas *unidades fraseológicas* (colocaciones, locuciones y demás formas o expresiones complejas).

16. Versión electrónica 4.01. https://www.cosnautas.com/es/catalogo/diccionario-medico-librorojo
17. Versión electrónica https://dtme.ranm.es/index.aspx
18. Más información en la web https://dle.rae.es/contenido/actualización-2021
19. N = nombre; Adj. = adjetivo; V = verbo; Adv. = adverbio.

Como veremos a continuación, en el caso de la pandemia coronavírica, no estamos faltos de ejemplos de todo lo expuesto.

Uno de los posibles, y quizá de los más representativos y simbólicos de dicha pandemia, a pesar de no ser voz necesariamente vinculada a ella, pues en realidad hace referencia a cualquier «aislamiento preventivo a que se somete durante un período de tiempo, por razones sanitarias, a personas, animales o cosas» (*DLE*, *s. v.* acep. 7), es el caso de **cuarentenear** y **cuarentenar**, a partir del sustantivo **cuarentena**, a su vez derivado de *cuarenta* (las dos creadas por sufijación: una, con el sufijo *-ear*, que forma verbos derivados de sustantivos o adjetivos; otra, con el sufijo *-ar*, que cumple la misma función pero solo a partir de sustantivos, con el valor semántico de «pasar un período de cuarentena» o «poner algo o a alguien en cuarentena»), así como **encuarentar** y **encuarentenar**, en este caso formadas por lo que llamamos *doble derivación* (prefijación + sufijación), al sumarse a la cadena de elementos el prefijo *en-*, en este caso solo con el segundo de los dos valores semánticos mencionados previamente. Todas ellas menos *encuarentar*[20] recogidas en el *DLE*[21].

Otro caso es la voz **gripalizar**, verbo, según la FundéuRAE[22], posiblemente creado bien del adjetivo *gripal* y el sufijo *-izar* (sufijo utilizado en español para crear nuevas formas verbales; lo que hemos denominamos anteriormente procedimiento de *verbalización*), bien del sustantivo *gripe*, el interfijo *-al-* y nuevamente el sufijo *-izar*. Y lo mismo ocurre con el sustantivo que de dicho término se deriva, **gripalización**, por la adhesión del sufijo *-ción* (sufijo utilizado en español para formar sustantivos deverbales que expresan acción y efecto; proceso de *nominalización*). Voces aún no recogidas ni en el *DLE,* ni en el *DHLE*, y utilizadas en sentido figurado para referirse a la necesidad de hacer un seguimiento de la covid semejante al que se realiza con la gripe.

Por su parte, entre los prefijos, quizá uno de los que más rendimiento ha tenido ha sido *anti–*, que denota «oposición», presente en términos como:

Anticovid. Derivado de *covid* y *anti-*. Atestiguado en el *DHLE*, *s. v.* en sus distintas variantes gráfico-fonéticas: anticovid, anti-covid, anti-COVID, anti covid, antiCovid. Presenta tres acepciones: 1. adj. Que combate o previene la covid. Sinónimos: anticovidiano, a; anticovídico, a; anticovidista. 2. *s. m.* Medicamento que combate la covid. 3. *s. m.* y *f.* Persona que cuestiona o minimiza la existencia y alcance de la pandemia de la covid. Sinónimo: anticovidiano, a. Todas ellas documentadas en 2020.

Anticovid-19. Atestiguado en el *DHLE s. v.* anticovid. 1. *s. m.* Medicamento que combate la covid. 2. *adj.* Que combate o previene la covid. Documentado desde 2020.

También presente en los sinónimos citados, aunque en este caso se trata de un proceso de doble derivación: **anticovidista** <de *covid*, con *anti-* e *-ista*>[23], **anticovidiano, a** <de *covid*, con *anti-* e *-iano, a*>[24] y **anticovídico, a** <de *covid*, con *anti-* e *-'ico, a*>[25].

Otro prefijo de gran rendimiento es *des-*, que significa «privación, negación, inversión del significado de la base» dando lugar a parejas de voces del tipo: **escalada** versus **desescalada** (a partir del verbo *escalar*), **confinamiento** versus **desconfinamiento** (a partir de los verbos *confinar* y *desconfinar*); y lo mismo ocurre con el prefijo *a-*, cuyo valor de «privación o negación» encontramos en **asintomático**, a partir de **sintomático**.

Igualmente, en este caso dentro de la composición, el término ***vacuna*** (deriv. ***vacunación***), era, lógicamente, otra de las voces idóneas susceptible de sucumbir a dichos procesos. Etimológicamente, procede del sustantivo *vaca* y del sufijo *-uno* «relativo a», «perteneciente o relativo al ganado bovino» (*DLE*, *s. v. vacuno, na*), siendo en su acepción 6 donde toma el sentido de «preparado de antígenos que, aplicado a un organismo, provoca en él una respuesta de defensa», <del ingl. *vaccine*, y este del lat. *vaccīnus* 'de la vaca'> U. t. en sent. fig.[26]. A partir de ella surgió el término **vacunódromo** (aún no incluido en el *DLE* ni en el *DHLE*), formado con la base culta *dromo* (<del griego δρόμος drómos>, que se refiere a un espacio de grandes dimensiones destinado a fines determinados, presente en otras voces del español, como *aeródromo*, *hipódromo*, *velódromo*, etc.); **vacuguagua** (de *vacu*, acrónimo de *vacunación* y *guagua*), tampoco incluida en ninguna fuente lexicográfica, aunque ampliamente utilizada por la población y medios oficiales de las

20. Citada por Navarro (2020: 790-791).

21. Téngase en cuenta que en el *DLE*, al ser un diccionario normativo, no cabe lo efímero, y que los nuevos términos que surgen solo se incorporan cuando estos han adquirido una amplia difusión social, se han generalizado y se han consolidado en el idioma. Es por ello por lo que si se precisa información inmediata sobre algún término específico nuevo, lo más recomendable es consultar un diccionario de especialidad o, en su caso, comprobar si el término ha sido incluido en el *DHLE*, ya que este otro diccionario sí que recoge todas las voces nuevas que afloran en la prensa, en las páginas web y en los distintos medios de comunicación, y que son de actualidad, pues vela por ofrecer información relevante sobre la historia de las palabras y su correcta interpretación en los textos.

22. *Cf.* https://www.fundeu.es/consulta/gripalizar-2/

23. *–ista*, es un sufijo utilizado para formar adjetivos que habitualmente se sustantivan; suele significar «partidario de» o «inclinado a». Véase covidista en el *DHLE* (*s. v.*).

24. *–iano, a* es un sufijo utilizado para formar adjetivos que significan «procedencia, pertenencia o adscripción». Véase covidiano en el *DHLE* (*s. v.*).

25. *–'ico, a* es un sufijo utilizado para formar adjetivos. Indica «relación» con la base derivativa. Véase covídico en el *DHLE* (*s. v.*).

26. Para más información sobre la historia de esta palabra, *cf.* https://www.fundeu.es/recomendacion/vacuna-palabra-del-ano-2021-para-la-fundeurae/

Islas Canarias[27], entendida como punto móvil de vacunación; y **vacunología** (sí incluida en el *DLE*, *s. v.*) <de vacuna + *-logía*, elemento compositivo que significa «tratado», «estudio», «ciencia» > *Med*. «Rama de la terapéutica que se ocupa del estudio de las vacunas».

Para terminar este epígrafe, nos detendremos en las denominadas *unidades fraseológicas* (también *expresión pluriverbal* o *expresión fija*). No podemos demorarnos en exceso en explicar en qué consisten y cuáles son sus diferencias, se excede a los objetivos de este capítulo, pero solo a grandes rasgos y a título informativo debemos decir que se trata de estructuras prefabricadas, combinaciones frecuentes de palabras de las que se vale el hablante en sus producciones lingüísticas y cuyos límites van del sintagma formado por al menos dos palabras gráficas hasta oraciones compuestas (Corpas 1996: 14-15). Estas se caracterizan por

> su alta frecuencia de uso, y de coaparición de sus elementos integrantes; por su institucionalización, entendida en términos de fijación y especialización semántica; por su idiomaticidad y variación potenciales; así como por el grado en el cual se dan todos estos aspectos en los distintos tipos (ídem: 20).

Nos referimos, en concreto, a las denominadas *colocaciones*, *locuciones* y *enunciados fraseológicos* (*paremias* y *fórmulas rutinarias*), procedimientos que también han estado muy presentes en esta pandemia, como no podría ser de otra manera, ya que, en efecto, como bien dice Castillo Carballo en el prólogo de su libro, «la fraseología impregna nuestras vidas [...] combinamos las palabras que ya otros combinan, y funciona» (2015: 11).

En concreto, nos centraremos en un número importante de combinaciones nominales (salvo las que tienen la estructura de verbo + sustantivo) con cierto grado de fijación y de cierta idiomaticidad en algunas de ellas (sobre todo, por los desplazamientos semánticos que experimentan algunos de sus componentes), que se enmarcan dentro de la primera y segunda esfera de Corpas Pastor (colocaciones y locuciones, respectivamente), por ser quizás las que han dado más juego[28]. A título de ejemplo, citamos las siguientes secuencias[29]:

Estructura categorial: sustantivo + adjetivo: *distanciamiento social, portador activo, portador/paciente asintomático, aislamiento sanitario, cerco sanitario, aislamiento social, inmunización activa/pasiva, agente infeccioso, agente patógeno, alerta epidemiológica, brote epidémico, información epidemiológica, carga viral, insuficiencia respiratoria, mascarilla quirúrgica, gel desinfectante, gel hidroalcohólico, curva ascendente/descendente, casos confirmados*, etc.

Estructura categorial: sustantivo + preposición + sustantivo: *curva de contagio, higiene de mano, orden de cierre, período de incubación, período de transmisibilidad, prueba/test de anticuerpos, rastreo de contactos, riesgo de contagio, dosis de recuerdo, grupo de control, grupo de riesgo, tasa de contacto, tasa de incidencia, tasa de letalidad, tasa de morbilidad, tasa de mortalidad, estado de emergencia, estado de alarma, pico de curva, inmunidad de grupo,* etc.

Estructura categorial: verbo + sustantivo (objeto): *frenar la curva, aplanar la curva,* etc.

Por último, mencionamos algunos ejemplos que podrían ser considerados neologismos semánticos, en tanto en cuanto la coaparición léxica de ambos elementos ha dado lugar a un sentido diferenciado, advirtiéndose casi un proceso de metaforización[30]. Son los siguientes:

> ***inmunidad de rebaño***. «Para referirse a la teoría de que, si la mayor parte de una población se inmuniza frente a un virus, este grupo proporcionará protección indirecta a los no vacunados».
> ***nueva normalidad***. «Situación en que la forma de vida normal o habitual se modifica debido a una crisis o a razones excepcionales»; p. ej., en una pandemia (*DLE*, *s. v.* normalidad).
> ***burbuja social***. «Dícese de en una pandemia o epidemia, grupo reducido de personas que pueden mantener contacto regular entre sí con escaso riesgo de contagio» (*DLE*, *s. v.* burbuja).
> ***paciente cero***. «Término usado para describir al primer humano infectado por un virus o una enfermedad infecciosa».
> ***segunda/tercera/cuarta ola***. «Nuevo brote del mismo agente patógeno que se desarrolla una vez ha disminuido el brote inicial».

3.2. Préstamos léxicos

En el caso de inclinarse el hablante por adoptar un préstamo de otra lengua, ya hemos comentado previamente que lo más apropiado y lógico es que este termine adaptándose a los patrones creativos del sistema. Es lo que ha ocurrido con el término por antonomasia en esta pandemia, **coronavirus**, procedente del inglés *coronavirus*, a partir de *corona* «corona solar», por el aspecto del virus al microscopio, y este del lat. CORŌNA «corona», y *virus*

27. Véase, por ejemplo, https://www3.gobiernodecanarias.org/noticias/tag/vacuguagua/

28. No entraremos en establecer compartimentos estancos entre estas unidades, porque, al margen de la catalogación, lo realmente interesante es dar cuenta de la combinatoria habitual generada a raíz de la pandemia.

29. *Cf*. Tarek Shaban Mohamamad Salem (2021: 112-128). De dicho trabajo hemos extraído los ejemplos que aportamos así como, en su caso, las definiciones que el autor nos ofrece, por estar ausente la combinación del *DLE*.

30. Para un conocimiento más profundo de la materia, *cf*. Castillo Carballo (2015: 61-113).

«virus», y este del lat. VIRUS «veneno», «ponzoña», con el significado: 1. m. *Med*. Virus que produce diversas enfermedades respiratorias en los seres humanos, desde el catarro a la neumonía o la COVID (*DLE*, *s. v.*)[31]. Dicho término convive en nuestra lengua con otros cuatro términos: el sustantivo femenino **coronavirosis**, probablemente calco del inglés *coronavirosis*, según el *DHLE*, con el significado de «enfermedad respiratoria o intestinal causada por un coronavirus», aún no recogido en el *DLE*, pero sí *virosis* <de *virus*>, 1. f. Enfermedad cuyo origen se atribuye a virus patógenos (*DLE*, *s. v.*); **coronaviral**, igualmente calco del inglés *coronoviral*, no recogido tampoco aún en el *DLE*, pero sí el término *viral* <del ingl. *viral*, y este de *virus* «virus» y *-al* «-al»> con el sentido de 1. adj. Perteneciente o relativo a los virus (sí lo recoge también el *DHLE*); **coronaviroso, a**, derivado de *coronavirus* y *-oso, a*. 1. *s. m. y f*. Persona que tiene coronavirus. 2. *adj*. [Persona] Que tiene coronavirus (no recogido en el *DLE*, pero sí en el *DHLE*, *s. v.*); y **coronavírico**. 1. adj. *Med*. Perteneciente o relativo al coronavirus (*DLE*, *s. v.*), en este caso un derivado de *coronavirus* e *-ico, a*. En definitiva, dos calcos del inglés (en su origen latino, formas compuestas), *coronavirosis* y *coronaviral*, y dos formas derivadas ya creadas en español a partir del anglicismo *coronavirus*, una ya aceptada e incorporada al diccionario académico normativo en su versión 23.4 (2020), *coronavírico*, y otra descartada, *coronaviroso,* por el propio valor semántico del sufijo *-oso, a*, ya que *-ico, a* se ajusta mejor a la definición de la enfermedad, al remitir a la relación que se establece con la base léxica, «perteneciente o relativo a»[32]. Algo similar a lo ocurrido también con *coronavírico* y *coronaviral* y demás términos afines[33].

Otro término especializado interesante es **viricida**, probablemente <de *virus* + el elemento compositivo *-cida*, del lat. -CĪDA, de la raíz de CAEDĔRE «matar»>, que significa «matador» o «exterminador», igualmente presente en otros términos como *herbicida*, *insecticida*, *bactericida*, etc. (*DLE*, *s. v. -cida*), atribuido a desinfectantes o productos químicos, aunque la web CCMSalud[34] puntualiza que su uso con este sentido es inapropiado, ya que un virus no se considera un organismo vivo al no tener un metabolismo interno, por lo que no puede «matarse». El término en cuestión no aparece en la nómina de voces del *DLE*, ni del *DHLE*, aunque sí lo encontramos en el *Diccionario de términos médicos* (*s. v.*)[35]:

> **viricida**
> 1 [ingl. *antiviral*, *viricidal*] adj. Que mata o es capaz de matar los virus.
> 2 [ingl. *antiviral*, *viricide*] *s. m.* Fármaco o sustancia de acción viricida.
> OBS.: Es incorrecta la forma ~~virucida~~[36].

Por la información que este aporta, lo más lógico es pensar que se trate de un préstamo del inglés *viricide*, adaptado fonéticamente al español por analogía con los otros términos citados anteriormente y de similar naturaleza. De ahí que la forma *virucida*, a partir de *virus*, tampoco sea la adecuada.

Un último ejemplo también digno de mencionar es **flurona** <del inglés *flu* abreviamiento de *influenza*, usado en inglés para nombrar la gripe, y *-rona*, de «corona (virus)»>[37], aparecido en algunos medios para referirse la infección conjunta de gripe y covid, es decir, a lo que siguiendo los recursos morfológicos del español se podría denominar **coronagripe**. Ni uno ni otro aparecen recogidos en los diccionarios al uso[38].

3.3. Neologismos semánticos

Otra opción posible era tomar partido no por crear una nueva voz, ni por tomarla prestada de otro idioma, sino por aprovechar una ya existente en español y ampliar su significado. Así pues, más allá de lo previamente indicado de la voz *cribado*, encontramos otros muchos casos de términos ya existentes que se han adaptado a la medicina PCR, como ocurre con **hisopo**, voz marcada en su acepción 4. diatópicamente como propia de *Arg., Bol., Ec., Méx., Nic., Par., P. Rico, R. Dom., Ur.* y *Ven.* para referirse al «palillo recubierto de algodón en sus puntas, usado para la higiene personal o para tomar muestras

31. Hemos de tener en cuenta que el latín y el griego son la base de muchos léxicos de especialidad, sobre todo de los de carácter científico, y que el inglés, a pesar de ser una lengua de origen germánico, tiene muchas voces de origen latino (según el Ministerio de Educación y Ciencia, el 65 % de los términos de la lengua inglesa provienen del latín, aunque este porcentaje puede variar según se trate de un inglés científico o culto [85 %] o de un inglés más coloquial [35 %]).

32. Ambos términos han sido utilizados indistintamente como sinónimos durante algún tiempo. Para más información sobre el tema, *cf*. la consulta hecha por *Redacción Médica* a la Fundéu y el argumento científico que esta esgrimió a favor de la forma derivada con *-ico, a*. https://www.redaccionmedica.com/secciones/sanidad-hoy/-coronavirico-o-coronaviroso-la-fundeu-opina-ante-el-covid-19--4848

33. Fernando A. Navarro aborda dicha cuestión en uno de sus artículos (2020b), dejando constancia de la mayor presencia del sufijo *–al* en inglés que es español a la hora de formar adjetivos especializados: *microbi**al*** (EN) – *microbi**ano*** (SP) / *bacteri**al*** (EN) – *bacteri**ano*** (SP) / *fung**al*** (EN) – *fúng**ico*** (SP) / *vir**al*** (EN) – *víri**co*** (SP) / *coronovir**al*** (EN) – *coronavíri**co*** (SP). Más información en https://www.agenciasinc.es/Opinion/Como-hablar-y-escribir-bien-sobre-la-pandemia-coronavirica-las-dudas-basicas

34. https://salud.ccm.net/faq/23312-viricida-o-virucida-definicion

35. https://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL_BUS=8&LEMA_BUS=viricida. También la FundéuRAE se pronuncia a propósito de lo adecuado de utilizar *viricida* y no *virucida*, aunque no justifica lingüísticamente el porqué.

36. Tachado en el original.

37. *Cf*. https://elpais.com/ideas/2022-01-23/gripalizar-la-fluorona.html

38. Para más información sobre la terminología en lengua inglesa, consúltese *The Coronavirus Corpus*, disponible en la web https://www.english-corpora.org/corona/

biológicas de una parte del cuerpo» (*DLE*, *s. v. hisopo*[1])[39]; y, a partir de esta, **hisopado**, con una única acepción y con la marca diatécnica *Med.*, por ser propia de dicho lenguaje especializado, también natural de diversos países hispanoamericanos. 1. m. *Med. Arg., Bol., Ec., Méx., Nic., Par., P. Rico, R. Dom., Ur. y Ven*. «Prueba consistente en tomar una muestra biológica de una parte del cuerpo, especialmente de la región bucal o nasofaríngea, con un hisopo sanitario, principalmente para la detección de infecciones; p. ej., por coronavirus» (*DLE*, *s. v.*).

Otro ejemplo digno de interés que nos puede, además, mostrar lo que implica la tarea del lexicógrafo a la hora de descubrir y fijar el sentido y empleo de cada voz, es el sustantivo ya mencionado anteriormente **confinamiento**, lema incorporado al *DLE* en 1843 (9.ª edición) y que dadas las circunstancias amplió su valor semántico en 2020 con una nueva acepción, la 2., m. «Aislamiento temporal y generalmente impuesto de una población, una persona o un grupo por razones de salud o de seguridad». Como explica la RAE/ASALE:

> Con esta definición se quiere destacar una serie de rasgos que no aparecen mencionados en el verbo del que esta palabra deriva, por lo que no podría entenderse *confinamiento* solo como la acción o el efecto de confinar («encerrar o recluir algo o a alguien en un lugar determinado o dentro de unos límites», con uso pronominal: *Se confinó en casa*). Estos rasgos específicos del sustantivo[40] serían la duración («aislamiento temporal»), el carácter obligatorio («aislamiento impuesto»), el tipo de paciente gramatical (no un individuo o un grupo de individuos, sino «una población» en general) o los motivos del aislamiento («por razones de salud o seguridad»)[41].

Igualmente, **mascarilla** (<*máscara* + sufijo apreciativo diminutivo *-illa*> lexicalizado)[42] es otra de las voces «estrellas» de esta pandemia. Como consecuencia de ella, esta voz ha modificado o afinado ligeramente su sentido, en lo que atañe a su acepción 2., ganando en precisión: de «máscara que cubre la boca y la nariz para proteger al que respira, o a quien está en su proximidad, de posibles agentes patógenos o tóxicos» ha pasado a quedar definida como «máscara que cubre la boca y la nariz de su portador para protegerlo de la inhalación y evitar la exhalación de posibles agentes patógenos, tóxicos o nocivos». *Mascarilla quirúrgica, sanitaria* (*DLE*, *s. v.*)[43].

Por último, hemos de mencionar que el adjetivo **coronaviral**, del que ya hemos hablado anteriormente en el subapartado 3.2, como voz plenamente incorporada al español, ha desarrollado su propia entrada en el diccionario: **coronaviral**[2] Etim. Compuesto de *corona* y *viral* con el significado de «[Asunto relacionado con el coronavirus] Que se difunde con gran rapidez y despierta mucho interés», documentado por primera vez en un diario argentino: *«Coronaviral: pandemia con humor»* [19-03-2020] *Ámbito (Buenos Aires)* Ar (HD), como así consta en el *DHLE*, *s. v.*

3.4. Otras voces y demás creaciones jocosas o palabros[44]

Como colofón al apartado 3, dedicamos este epígrafe a una serie de palabras que la sociedad en general, más allá de lo que es el ámbito especializado de la medicina o la sanidad, ha creado, siguiendo los procedimientos de formación antes mencionados. En su mayoría, no las encontraremos nunca en el *DLE*, pues no pasarán a la posteridad y quedarán solo como un recuerdo de lo que fue (aunque aún lo es) dicha pandemia, pero también como testimonio de la capacidad que el hablante tiene de crear nuevas voces incluso sin ser consciente del procedimiento semántico, morfológico o sintáctico que aplica. Por el contrario, sí las hallaremos casi todas documentadas en el *DHLE*, atestiguadas en diversas hemerotecas digitales (HD)[45], dado que la función de este diccionario es precisamente dejar constancia de la vida de todas aquellas voces que en algún momento han formado parte del idioma, aunque su vida haya sido efímera o fugaz. En su mayoría, son formas compuestas a partir de las voces *corona* y *covid*. Asimismo, se puede apreciar cómo algunas contienen marcas diasistémicas – diasistemáticas (entre estas, aquellas que dan información desde el punto de vista sociolingüístico

39. En su acepción 2. m. Utensilio que se emplea en las iglesias para dar o esparcir agua bendita, consistente en un mango de madera o metal, con frecuencia de plata, que lleva en su extremo un manojo de cerdas o una bola metálica hueca y agujereada (*DLE*, *s. v.*).
40. El subraya es nuestro. Se sobreentiende que se refiere a los rasgos semánticos o *semas* (cada una de las unidades en las que se puede segmentar o descomponer el significado de las palabras).
41. Cita tomada de https://www.rae.es/noticia/las-palabras-del-ano-en-el-universo-hispanohablante cuyos textos, a su vez, están extraídos de la obra *Crónica de la lengua española* (2020) publicada por la RAE.
42. Cubrebocas (en EE. UU., Guatemala, México, Nicaragua y Uruguay), nasobuco (en Cuba y Nicaragua) barbijo o barboquejo (en Argentina, Bolivia, Paraguay y Uruguay). Todas ellas recogidas en el *DLE*.
43. El subrayado es nuestro.
44. Utilizamos estos términos por ser los utilizados por algunos profesionales en diversos medios de información al referirse a este tipo de voces, como es el caso de F. NAVARRO, quien en su artículo «La palabra del año 2020» [01-01-2021] *El Castellano* (Madrid): elcastellano.org Esp (HD) dice lo siguiente: «[...] Obsérvese que no dicen "palabra», sino un "palabro» (esto es, una palabra rara, estrafalaria o mal dicha). Como especifican cada año en la convocatoria, "nos proponemos encontrar un vocablo o una expresión que de alguna manera choque o chirríe al oyente o lector y que en este pandémico año de 2020 haya adquirido cierta notoriedad por su uso en los medios de comunicación, la política, la administración, la calle o las redes sociales»» (*DHLE*, *s. v. coronaplauso*).
45. HD es una de las fuentes documentales del *DHLE*: documentos procedentes de diversas hemerotecas virtuales.

o dialectal: marcas diastráticas y diafásicas <*coloq*. = coloquial> o diatópicas <*Ar*. = Argentina>), o pragmáticas (aquellas otras que introducen toda una serie de matices y valoraciones subjetivas; también denominadas de «valoración» o «actitud» <*desp*. = despectivo>)[46]. En cuanto a las fuentes documentales, podemos encontrar tanto artículos en revistas especializadas como columnas de opinión en prensa española o americana.

Entre otras, las siguientes:

A partir de *corona* y *coronilla* <corona + -illa, diminutivo de *corona*; término lexicalizado).

coronabono (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *bono*. 1. *s. m.* Bono de deuda que emiten entidades bancarias e instituciones gubernamentales para contribuir a paliar la crisis económica causada por la pandemia del coronavirus. 1.ª doc. Pérez, C. *«Coronafinanzas»* [28-02-2020] *Diario de Sevilla (Sevilla)* Esp (HD).

coronaplauso (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *aplauso*. 1. *s. m.* Aplauso sincronizado de la población para agradecer la labor de los trabajadores esenciales durante la pandemia del coronavirus. 1.ª doc. 2020 Gtz Rodilla, B.M. *«El lenguaje efectos pandemia»* [06-07-2020] *Epidemias y Salud Global (Madrid)* Esp (HD).

coronabebé (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Calco del inglés *coronababy*, y esta, a su vez, de *corona* y *baby*. 1. *s. m. y f.* Bebé nacido durante la pandemia del coronavirus. 1.ª doc. Bilefsky, D. / Yeginsu, C. «*Covidivorcios y coronabebés*» [30-03-2020] *Infobae (Buenos Aires): infobae.com* Ar (HD).

coronabicho (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *bicho*. 1. *s. m. coloq. desp.* Virus del género *Betacoronavirus* de tipo 2 que puede causar la covid. Sinónimos: corona; coronavirus; coronillavirus; covicho. 1.ª doc. Martín Melgar, G. *«Crisis farmacias coronavirus»* [20-03-2020] *Redacción Médica (Madrid): redaccionmedica.com* Esp (HD).

coronabulo, corona-bulo (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *bulo*. 1. *s. m.* Noticia falsa sobre el coronavirus que se difunde rápidamente. 1.ª doc. Gómez, A. *«Verdades y mentiras coronavirus»* [12-03-2020] *Diario Sur (Málaga)* Esp (HD).

coronachivato, a (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *chivato*. 1. *s. m. y f.* Persona que acusa o delata [a otra] por quebrantar las normas establecidas por las autoridades durante la pandemia del coronavirus. Sinónimo: **covichivato, a**. 1.ª doc. Navarro, F. A. *«Covid-19»* [23-09-2020] *Revista Española de Cardiología* (Madrid) Esp (HD).

coronacombi, corona-combi (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *combi*. 1. *s. m. Ar coloq.* Vehículo que transporta personas sin respetar las restricciones de movilidad establecidas por las autoridades durante la pandemia del coronavirus. 1.ª doc. Anónimo *«Vehículos rechazados ingresos Mar del Plata»* [08-06-2020] *ViaPaís (Buenos Aires): viapais.com.ar* Ar (HD).

coronacompra (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *compra*. 1. *s. f.* Compra realizada durante la pandemia del coronavirus, generalmente con sobreprecio. 1.ª doc. Caviglia, D. *«Coronavirus»* [29-05-2020] *La Nación (Buenos Aires)* Ar (HD).

coronacrisis, corona-crisis (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *crisis*. *Cf.*, no obstante, inglés *corona crisis*. 1. *s. f.* Crisis, principalmente económica, derivada de la pandemia del coronavirus. 1.ª doc. Bercovich, A. *«Diez plagas de Olivos»* [12-03-2020] *BAE Negocios (Buenos Aires)*: *baenegocios.com* Ar (HD).

coronadivorcio, corona-divorcio (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *divorcio*. 1. *s. m.* Divorcio producido tras el confinamiento por la pandemia del coronavirus. Sinónimo: covidivorcio. 1.ª doc. Anónimo *«Rápida propagación coronadivorcios»* [30-03-2020] *T13 (Santiago)* Ch (HD).

coronafiesta (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *fiesta*. 1. *s. f.* Fiesta celebrada durante la pandemia del coronavirus. Sinónimo: covifiesta. 1.ª doc. García, F. A. *«Todos sabían covidfiestas»* [22-05-2020] *La Jornada de Oriente (Tlaxcala)* Mx (HD).

coronafobia (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *corona* y *-fobia*[47]. 1. *s. f.* Miedo patológico al coronavirus. 1.ª doc. Ortega, I. *«Coronafobia»* [09-03-2020] *20 Minutos (Madrid)* Esp (HD).

coronillavirus (recogida en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *coronilla* y *virus*, creación humorística y un tanto anómala sobre *coronavirus* y la expresión *estar hasta la coronilla*, que expresa hartazgo. 1. *m. coloq. humor*. Virus del género *Betacoronavirus* de tipo 2 que puede causar la covid. Sinónimos: corona; coronabicho; coronavirus; covicho. 1.ª doc. Rivera, P. *«Médico está del coronavirus hasta la coronilla»* [09-03-2020] *El Español (Madrid): elespanol.com* Esp (HD).

A las que podemos añadir **coronapijos**, **coronaburrirse**, **coronacoma** o **coronabilis**; voces no documentadas ni en el *DLE* ni en el *DHLE* pero sí citadas en varios artículos escritos por F. A. Navarro[48].

A partir de *covid*:

autocovid (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *auto*[2] y *covid*, en sus distintas variantes gráfico-fonéticas: autocovid, autoCovid, auto-covid. Dicho lema tiene dos acepciones: 1. *s. m.* Prueba diagnóstica de covid en que la toma de la muestra se realiza en

46. Para más información sobre los tipos de marcas lexicográficas y sus funciones, *cf.* Azorín Fernández (2009).

47. *-fobia*. Del lat. cient. *–phobia*, y este del gr. *-φοβία –phobía*. 1. elem. compos. Significa «aversión» o «rechazo». *Xenofobia*, *hidrofobia* (*DLE*, *s. v.*).

48. *Cf.* los dos ejemplos suyos (de 2020 y 2021) que aporta el *DHLE*, *s. v. coronaplauso*, entre otras voces.

el automóvil del paciente. Sinónimo: **covidauto**. 1.ª doc. Anónimo «*Rastreadores Campo de Gibraltar*» [30-11-2020] *Europa Sur (Sevilla)* Esp (HD). 2. *s. m.* Lugar donde se realizan pruebas diagnósticas de covid mediante la toma de la muestra en el automóvil del paciente. Sinónimo: covidauto. 1.ª doc. Miranda, L. «*Salud confinar contactos contagiados*» [22-05-2020] *ABC (Córdoba)* Esp (HD).

covicho, cobicho (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Entrecruzamiento de *covid* y *bicho*. 1. *s. m. coloq*. Virus del género *Betacoronavirus* de tipo 2 que puede causar la covid. Sinónimos: corona; coronabicho; coronavirus; coronillavirus. 1.ª doc. Anónimo «*Show covicho*» [09-04-2020] *TVShow (Montevideo)*: *tvshow.com.uy* Ur (HD).

covidianidad (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Entrecruzamiento de *covid* y *cotidianidad*. 1. *s. f.* Vida diaria adaptada a las normas y protocolos derivados a la pandemia de la covid. 1.ª doc. Anónimo «*Nueva covidianidad*» [02-04-2020] *Diario Libre (Santo Domingo)* RD (HD).

covidiccionario, covid-diccionario (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *covid* y *diccionario*. 1. Compilación de palabras creadas o activadas en el uso durante la pandemia de la covid. Sinónimo: coronadiccionario. 1.ª doc. Tovar, J. «*Ensalada semántica*» [18-04-2020] *Agencia EFE (Madrid): efe.com* Esp (HD).

covidioma (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Entrecruzamiento de *covid* e *idioma*. 1. *s. m.* Vocabulario creado o activado en el uso durante la pandemia de la covid. Sinónimos: **coronalengua**; **coronalenguaje**. 1.ª doc. Colmán Gtz, A. «*Nacimiento coronalengua*» [20-06-2020] *Última Hora (Asunción)* Py (HD).

covidiota (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Calco estructural del inglés *covidiot*, voz atestiguada en esta lengua desde 2020 en la prensa, y consignada ya en el *Oxford Advanced Learner's Dictionary* (2020); y esta, a su vez, de *covid* e *idiot*. 1. *adj*. [Persona] Que se niega a cumplir las normas sanitarias dictadas para evitar el contagio de la covid. 1.ª doc. Ameneiro, A. S. «*Crisis sanitaria nuevas palabras*» [17-04-2020] *Diario de Sevilla (Sevilla)* Esp (HD).

covidivorcio (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Se trata de un calco del inglés *covidivorce* y esta, a su vez, de *covid* y *divorce*. 1. *s. m.* Divorcio producido tras el confinamiento por la pandemia del coronavirus. Sinónimo: coronadivorcio. 1.ª doc. Bilefsky, D. / Yeginsu, C. «*Covidivorcios y coronabebés*» [30-03-2020] *Infobae (Buenos Aires): infobae.com* Ar (HD).

covifiesta, covidfiesta (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *covid* y *fiesta*. 1. Fiesta celebrada durante la pandemia de la covid. Sinónimo: coronafiesta. 1.ª doc. García, F. A. «*Todos sabían covidfiestas*» [22-05-2020] *La Jornada de Oriente (Tlaxcala)* Mx (HD).

covichivato, a (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *covid* y *chivato*. 1. *s. m. y f.* Persona que acusa o delata [a otra] por quebrantar las normas establecidas por las autoridades durante la pandemia de la covid. Sinónimo: coronachivato, a. 1.ª doc. Navarro, F. A. «*Neocoronaléxico popular*» [01-08-2020] *Agencia EFE (Madrid): efe.com* Esp (HD).

covidofobia, COVIDofobia (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Compuesto de *covid* y el tema *-fobia*. 1. *s. f.* Miedo patológico a la covid. 1.ª doc. Dorado, Ó. «*Óscar Dorado*» [03-04-2020] *El Sol de Cuatla (Cuatla)* Mx (HD).

covídico, a (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Derivado de *covid* e *-ico, a*. 1. *adj*. Perteneciente o relativo a la covid. 1.ª doc. Agencia Efe «*Fundéu BBVA: vacuna contra COVID-19*» [25-03-2020] *Diario Libre (Santo Domingo)* RD (HD). 2. *adj*. [Persona] Que tiene covid. 1.ª doc. Gómez, I. «*Nadie estaba preparado para esto*» [07-05-2020] *Diario de Almería (Almería)* Esp (HD).

covidnoico, a (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Entrecruzamiento de *covid* y *paranoico*. 1. *s. m. y f.* Persona que muestra una preocupación obsesiva por la covid. 1.ª doc. Gutiérrez Rodilla, B. «*El lenguaje, entre los efectos de la pandemia* [07-2020] *Epidemias y Salud Global (Madrid)* Esp.

covidoso, a (recogido en el *DHLE*, *s. v.*, pero no en el *DLE*). Etim. Derivado de *covid* y *-oso, a*. 1. *adj*. Persona que tiene covid. Se documenta por primera vez, como adjetivo y con la acepción «que tiene covid», en abril de 2020, en un artículo publicado en *Al Poniente* (Medellín). En diciembre de 2020 se registra como adjetivo relacional («perteneciente o relativo a la covid»), en un artículo publicado en el diario *ABC (Madrid)*. Por su parte, como «persona que tiene covid» se atestigua en Araujo, K. «*Lucas Spadafora se contagió coronavirus*» [22-10-2020] *Gente (Buenos Aires): gente.com.ar* Ar (HD).

Y a las que podríamos seguir añadiendo muchas más, tampoco registradas como entrada ni en el *DHLE* ni el *DLE,* creadas en su mayoría con el término «virus» y consideradas de carácter malsonante o soez, como: *cabronavirus*, *confinavirus*, *mierdavirus*, *corinavirus*, *carallovirus*, *cojonavirus* (o *acojonavirus*), *coñazovirus*, *cornavirus*, entre otras ocurrencias igualmente frutos de la imaginación y las circunstancias: *aplausazos*, *balconazis*, *resistireners coronito*, *cuarempena*, *epimiedólogo*, *fuñigar*, *plandemia*, *sinfinamiento*, *vinollamada* y *nueva anormalidad*[49].

Por último, cerramos este epígrafe con una palabra que si bien no está directamente relacionada con el virus ni la enfermedad, sí que lo está con la pandemia. Se trata de **teletrabajo**, a partir de *tele-*[I] <del gr. τηλϵ- *tēle-*>, elemento compositivo que significa «a distancia», presente en otras voces como *teléfono* o *televisión*, y el sustantivo *trabajo*. Dicha voz si está recogida en el *DLE*, porque indudablemente ha venido para quedarse, aunque no así su derivado **teletrabajar**, que aún no aparece recogido en dicha fuente lexicográfica.

49. Recogidas nuevamente por F. A. Navarro y B. Gutiérrez Rodilla en sus artículos (*cf. DHLE*, *s. v. coronaplauso*).

4. PRECISIÓN LÉXICO-SEMÁNTICA Y DIFUSIÓN TERMINOLÓGICA

Otra cuestión que queremos abordar es la relacionada con la precisión léxica a la hora de expresarnos y la necesidad de saber lo que se dice y de lo que se habla, sobre todo cuando se trata de un lenguaje tan complejo como el médico-sanitario. En este sentido, la pandemia también nos ha enseñado algo al respecto.

Lamentablemente, **mortalidad** y **letalidad** han sido dos de los términos que más presentes han estado en nuestras vidas durante la pandemia. Todos hemos estado diariamente pendientes de los datos oficiales y de los comunicados que desde el gobierno o las administraciones se emitían por distintos medios, sin embargo, es posible que pocas veces hayamos podido saber con seguridad si esos datos eran los reales o no, entre otros motivos porque continuamente se «jugaba» con las magnitudes, y los resultados cambiaban en función de los intereses, no siempre científicos.

Tampoco en este caso el diccionario (*DLE*) nos era muy útil, dado que la definición aportada tampoco nos ayudaba mucho a establecer las diferencias:

> **mortalidad**. 1. f. Cualidad de mortal. 2. f. Tasa de muertes producidas en una población durante un tiempo dado, en general o por una causa determinada.
> **letalidad**. 1. f. Cualidad de letal. 2. f. mortalidad (‖ tasa de muertes).

Tanto una como otra hacían referencia a la *tasa de muertes* ¿Podrían pues considerarse sinónimas? Por su parte, *mortal* y *letal*, tampoco nos sacaban de dudas, y el concepto de *tasa* menos aún aclaraba el concepto:

> **tasa** 1. f. Acción y efecto de tasar. 2. f. Relación entre dos magnitudes. *Tasa de inflación, de desempleo, de natalidad*. 3. f. Tributo que se impone al disfrute de ciertos servicios o al ejercicio de ciertas actividades.

Sin embargo, lo cierto es que hablar de tasa *de mortalidad*, *de letalidad* (o de *morbilidad*, *incidencia* o *contacto*) era aludir a realidades bien distintas. Según las noticias publicadas por la BBC News Mundo el 10 de abril de 2020[50], cuando hablamos de la *tasa de mortalidad* específica de una enfermedad, en este caso COVID-19, nos estamos refiriendo a:

> **la proporción de fallecimientos** en un período en una población concreta. Normalmente se expresa como el número de muertes por cada 1.000, 10.000, 100.000 o un millón de habitantes (dependiendo de lo pequeña que sea la tasa). Por ejemplo, multiplicando los fallecimientos por 100.000 y dividiendo el resultado **entre la población total**[51].
> En cambio, la tasa o índice de *letalidad* se refiere al cociente de fallecimientos **en relación con las personas que se han contagiado de dicha enfermedad**, cuyo resultado se suele multiplicar por 100 para mostrar el porcentaje.

A continuación, se muestran las referencias a las que alude cada colocación (o estructura pluriverbal)[52]:

> **Tasa de contacto**: tasa a la que un individuo infectado infecta a otros sujetos susceptibles a la infección.
> **Tasa de incidencia**: indicador epidemiológico que indica la ocurrencia de casos nuevos de una enfermedad dentro de una población definida durante un período específico.
> **Tasa de letalidad**: proporción de personas que mueren por una enfermedad específica en relación con el total de pacientes afectados.
> **Tasa de morbilidad**: cantidad de individuos considerados enfermos o que son afectados por una enfermedad en un espacio y tiempo determinado.
> **Tasa de mortalidad**: número de personas que mueren por un evento sanitario en una población y período de tiempo determinados, en relación con el total de la población.

Algo similar ocurría con *epidemia* «enfermedad», «un país» y *pandemia* «enfermedad epidémica», «muchos países», «contagio mundial». Todas ellas, apreciaciones semánticas significativas:

> **epidemia** 1. f. Enfermedad que se propaga durante algún tiempo por un país, acometiendo simultáneamente a gran número de personas. 2. f. Mal o daño que se expande de forma intensa e indiscriminada (*DLE*, *s. v.*).
> **pandemia** 1. f. *Med*. Enfermedad epidémica que se extiende a muchos países o que ataca a casi todos los individuos de una localidad o región, estado de alarma global, crisis sanitaria, contagio mundial (*DLE*, *s. v.*).

Y lo mismo, con términos tales como *disforia* o *disnea*, cuya apariencia fónica y morfológica, ante un no siempre prefijo *dis-*[2] (del griego δυσ- *dys-*), inducían a la confusión:

> **disforia** 1. f. *Med*. Estado de ánimo de tristeza, ansiedad o irritabilidad (*DLE*, *s. v.*).
> **disnea** 1. f. *Med*. Dificultad de respirar (*DLE*, *s. v.*).

O con *inocular* e *inyectar,* siendo *inocular* un término genérico para referirse a la acción de administrar

50. *Cf*. https://www.bbc.com/mundo/noticias-52230846

51. Las negritas son nuestras.

52. *Cf*. Tarek Shaban Mohamamad Salem (2021: 112-128).

una vacuna, mientras que *inyectar* se refiere a una forma concreta de hacerlo[53]:

> **inocular** 1. tr. *Biol*. y *Med*. Introducir en un organismo una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad (*DLE*, *s. v.*).
> **inyectar**. 2. tr. Introducir en el cuerpo, mediante una aguja unida a una jeringuilla, un líquido o una disolución de un medicamento (*DLE*, *s. v.*).

Entre otras cuestiones *coronalingüísticas*, como las llama Fernando Navarro, como son las diferencias semánticas que existen entre cuatro adjetivos entendidos generalmente como sinónimos sin serlos: **inmune** «que presenta inmunidad, que no es atacable por ciertas enfermedades», **inmunitario** «de la inmunidad o relacionado con ella», **inmunológico** «de la inmunología (ciencia que se ocupa del estudio de la inmunidad) o relacionado con ella» e **inmunizante** «que confiere inmunidad». Y de ahí la oportunidad de decir: «niños *inmunes*», «respuesta *inmunitaria*», «enfermedades *autoinmunitarias*», «pruebas *inmunológicas*» y «suero *inmunizante*», pero nunca «sistema *inmune*» (puesto que no lo es en absoluto) ni «sistema *inmunológico*» (puesto que el sistema inmunitario existe en la naturaleza desde muchísimo antes de que naciera la inmunología; de hecho, desde muchísimo antes incluso del primer homínido) a lo que debe ser llamado «sistema *inmunitario*»[54].

Y lo mismo cabría decir sobre **tamizaje** y **cribado**, **intubar** (más específica que *entubar*) e **intubación** (más específica que *entubación*), **apanucar** (y no *apanicar*) **resiliencia**, **triaje**, etc. Términos todos ellos de ámbitos especializados que han trascendido a la sociedad y que nos hemos visto obligados a aprender y asimilar, para entender y hablar con propiedad de la pandemia coronavírica.

5. CORONAVIRUS DISEASE 2019. SOBRE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

Para finalizar, dedicamos este último epígrafe a la tan debatida sigla COVID-19, creada a partir del nombre de este organismo que con tanta virulencia removió los cimientos y estructuras políticas y socioeconómicas del mundo, así como la vida del ser humano. Dado que las siglas y los acrónimos también forman parte del universo de la creación léxica, no podíamos terminar este estudio sin explicar el porqué de dicha sigla y su uso correcto.

5.1. Cuestiones de ortografía

Cuando en determinados ámbitos (científicos, tecnológicos, institucionales, empresariales, políticos o administrativos, entre otros) se crean nuevas expresiones complejas (expresiones pluriverbales fijas[55]), surge la tendencia de abreviarlas. La intención no es otra que simplificarlas, minimizando así el esfuerzo a la hora de reproducirlas (de manera oral o escrita) para aludir a ellas de manera más efectiva. Dicha actitud responde a uno de los principios o fenómenos básicos y naturales que rige el lenguaje humano: el de la *economía lingüística* o *economía del lenguaje*. Dentro de este proceso se sitúan las *abreviaturas* y las *siglas*, y dentro de estas últimas los llamados *acrónimos*. Se trata, pues, de dos procedimientos de abreviación gráfica, cuyos orígenes se remontan a la época romana y cuyo uso se acrecienta cada día más en la actualidad. En cuanto a las normas que los regulan, estas quedan recogidas en el volumen de *Ortografía* elaborado por la RAE/ASALE (2010: 564-586). De ambos procedimientos, es el relativo a las siglas el que en este momento nos interesa especialmente.

De forma generalizada, entendemos por una sigla al «signo lingüístico formado con las letras iniciales de cada uno de los términos que integran una expresión compleja» (RAE/ASALE 2010: 577). Se trata, precisamente, de uno de los procedimientos de creación léxica más activos y productivos en estos momentos en español, quizá como proyección del alto rendimiento que este tiene en la lengua inglesa y en el ámbito internacional.

Este tipo de unidades léxicas se forman por yuxtaposición, a través de la unión directa y sucesiva de las letras iniciales de cada una de las palabras con contenido léxico (sustantivos, adjetivos, adverbios) que conforman dicha expresión, omitiéndose las gramaticales (preposiciones, conjunciones, artículos), es decir, aquellas que carecen de carga semántica, por ejemplo, US (por *Universidad de Sevilla*), EUS (por *Editorial de la Universidad de Sevilla*) o ANEP (por *Agencia Nacional de Evaluación y Prospectiva*). No obstante, en ocasiones y por diversos motivos –bien porque dicho elemento gramatical tenga una importante carga significativa, como ocurre, por ejemplo, con el término FECYT (por *Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología*), o por facilitar su pronunciación o hacer más legible, como en el caso de ASALE (por *Asociación de Academias de la Lengua Española*)–, se pueda añadir algún elemento más. También es posible, aunque solo ocasionalmente, añadir elementos no

53. https://www.fundeu.es/recomendacion/vacuna-palabra-del-ano-2021-para-la-fundeurae/
54. Información tomada de su esclarecedor e interesante artículo en: https://www.agenciasinc.es/en/view/content/280950/full/1/127732
55. Sin entrar en mayor detalle, este término alude en general a todas aquellas unidades que cumplen los siguientes requisitos: «(i) Constan de al menos dos palabras ortográficas. (ii) Presentan cierto grado de lexicalización. (iii) Se caracterizan por la alta frecuencia de coaparición en la lengua» (Corpas 1996: 18).

alfabéticos, como ocurre en I+D (por *investigación y desarrollo*), E/LE (por *Español como lengua extranjera*) o E/L2 (por *Español como segunda lengua*). Asimismo, de manera tradicional, cuando una pieza léxica estaba constituida por la combinación de segmentos de cifras y letras lo habitual era separarlos por un guion, lo que ocurre, por ejemplo, en SE-30 (*Autovía de Circunvalación de Sevilla*), sin embargo, actualmente se puede prescindir de él, como en MP3, sigla que deriva de MPEG (*Moving Pictures Experts Group*) Audio Layer III. En cuanto al uso de mayúsculas y minúsculas, todas las siglas se escriben en mayúsculas, sin puntos y sin tildes, a excepción de los acrónimos que son nombres propios y contienen cinco letras o más. En este caso, pueden escribirse solo con la mayúscula inicial y llevar tilde o no en función de las normas habituales al respecto. Por el contrario, si el acrónimo es considerado un nombre común, entonces las normas que rigen son las propias de este: se escriben en minúscula, se acentúan gráficamente conforme a las normas de acentuación y forman el plural igualmente de modo regular[56].

En realidad, los acrónimos no son sino siglas cuya configuración permite realizar una lectura secuencial de estas, es decir, sílaba a sílaba. Dichos elementos léxicos, en ocasiones, pueden incluso lexicalizarse y adquirir, como hemos comentado, el estatus propio de una palabra, de un sustantivo común, sucumbiendo así a todas las normas que los regulan. Un ejemplo claro de distinción de ambos conceptos es el que aporta la FundéuRAE[57] en su página web: «ONU es sigla y acrónimo, pues se lee /ó-nu/, a diferencia de la sigla BCE, que es sigla, pero no acrónimo, pues se lee deletreando: /bé-cé-é/».

En cuanto al criterio de uso de la cursiva, en la *Ortografía de la lengua española* (RAE/ASALE 2010: 585) solo se indica que debe marcarse así siempre que las siglas correspondan a título de libros o publicaciones periódicas, dado que cuando se escriben desarrolladas se escriben con ese mismo tipo de letra, como con *DLE* (*Diccionario de la Lengua Española*) o *DPD* (*Diccionario Panhispánico de dudas*).

Si trasladamos todo lo expuesto a la pandemia coronavírica, podremos entender mejor por qué se denomina COVID-19 a la nueva enfermedad respiratoria denominada por la OMS (*Organización Mundial de la Salud*) *coronavirus disease 2019* y SARSCoV-2 a su virus causal o *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, como lo denominó el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (en inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses* o ICTV). Del mismo modo, también comprenderemos por qué generalmente se escribe COVID-19, en cuanto *sigla* que es, con todas las letras en mayúscula[58], y por qué en otras ocasiones aparece escrita, como forma lexicalizada, totalmente en minúscula covid-19. De momento, el *Diccionario de la Lengua Española* (*DLE*), en su última actualización de 2021, recoge el término escrito íntegramente en mayúscula, en consonancia con su origen inglés, aunque, en efecto, al tratarse de un *acrónimo lexicalizado*, del que la mayoría de los usuarios de la lengua desconocen cuál es la expresión compleja que subyace (*coronavirus disease 2019*), es igualmente correcto escribirlo todo en minúscula, como nombre común; no así con solo la primera letra en mayúscula Covid-19, pues no se trata de un nombre propio, por lo que iría contra la norma. En cuanto a su pronunciación, el uso oscila entre considerarlo palabra llana (como en inglés) o palabra aguda (como en español), en la escritura, cóvid versus covid, respectivamente.

5.2. Cuestiones de morfología gramatical: el artículo

Otro de los problemas surgidos a la hora de referirnos al *coronavirus disease 2019* es si dicho acrónimo debe ir precedido del artículo masculino o femenino: *¿el* o *la* covid-19? No es de extrañar que haya surgido esta duda, dadas las particularidades que al respecto presenta la lengua española: una de ellas es el hecho de que haya palabras históricamente femeninas en español precedidas de un falso artículo masculino[59], como es el caso de los sustantivos que empiezan con *a-* o *ha-* tónicas: *el aula*, *el alma*, etc.; otra, el que haya sustantivos en español que admiten los dos géneros, los denominados sustantivos ambiguos, como ocurre con *el mar / la mar*, *el radio / la radio*, *el azúcar / la azúcar*, *el calor / la calor*, *el pijama / la pijama*, *la avestruz / el avestruz*, etc. Tras esta última particularidad subyacen circunstancias de diversa índole: en unas ocasiones se trata de cuestiones de carácter diafásico, como por ejemplo *el radio* (acortamiento de *radiorreceptor*) con género masculino en el

56. Para un análisis detallado de la cuestión, véase RAE/ASALE 2010: 421-422, 509-512, 577-585.

57. https://www.fundeu.es/recomendacion/siglas-y-acronimos-claves-de-redaccion/

58. Es la forma que utiliza la OMS.

59. Falso masculino porque, en realidad, procede del femenino latino *illa*. Como indica el DPD, «El artículo femenino *la* deriva del demostrativo latino *illa*, que, en un primer estadio de su evolución, dio *ela*, forma que, ante consonante, tendía a perder la *e* inicial: *illa* > *(e)la* + consonante > *la*; por el contrario, ante vocal, incluso ante vocal átona, la forma *ela* tendía a perder la *a* final: *illa* > *el(a)* + vocal > *el*; así, de *ela agua* > *el(a) agua* > *el agua*; de *ela arena* > *el(a) arena* > *el arena* o de *ela espada* > *el(a) espada* > *el espada*. Con el tiempo, esta tendencia solo se mantuvo ante sustantivos que comenzaban por /a/ tónica, y así ha llegado a nuestros días. El uso de la forma *el* ante nombres femeninos solo se da cuando el artículo precede inmediatamente al sustantivo, y no cuando entre ambos se interpone otro elemento [...]» (más información en https://www.rae.es/dpd/el).

lenguaje coloquial frente a *la radio*, en femenino, en la lengua escrita y el lenguaje formal; en otras, son razones de carácter diatópico, como es el caso de *el/la calor*, voz de género masculino pero utilizada en Andalucía y otros lugares de América en femenino, o *el/la pijama*, voz de género masculino que en algunos lugares de América se utiliza en femenino. También los vínculos afectivos o la sensibilidad poética influyen como, por ejemplo, en el caso de *el/la mar*; y en otros es el desconocimiento por parte de los hablantes del género que corresponde, caso de *el/la avestruz*.

En lo que respecta a las siglas y acrónimos, estos adoptan el género de la palabra que constituye el núcleo de la expresión abreviada, que normalmente ocupa el primer lugar en la denominación. En el caso que nos ocupa, el uso del masculino o femenino dependerá de si nos referimos a la enfermedad o al virus. Así pues, en este caso, según la fundéuRAE, es posible emplear ambos géneros, puesto que la sigla COVID está formada a partir de *coronavirus disease* «enfermedad del coronavirus» («coronavirosis de 2019»), por lo que admite el artículo femenino, a partir del sustantivo «enfermedad», al igual que ocurre con *el* SIDA o *la* ELA, cuyos artículos están en función de «el síndrome» (*síndrome de inmunodeficiencia adquirida*) o «la esclerosis» (*esclerosis lateral amiotrófica*). Por el contrario, si nuestra intención es hacer referencia al virus causal, entonces, lo procedente sería usar el masculino, al igual que hacemos con otras enfermedades víricas como *el ébola* o *el zika*, aunque quizá en este último caso sería más apropiado utilizar la sigla que el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus determinó para dicho virus: el SARS-CoV-2.

CONCLUSIÓN[60]

Como se ha podido apreciar en las páginas precedentes, la pandemia coronavírica ha servido, entre otros muchos aspectos, para demostrar que las lenguas son entes vivos, que nacen, crecen, se desarrollan y pueden llegar incluso a morir, y que somos nosotros, los hablantes, los usuarios del idioma, los responsables de dicho proceso, al conjugar nuestra capacidad innata para crear nuevas voces con las posibilidades que ofrecen las lenguas de poner en marcha dicha aptitud. El virus y la enfermedad que ha asolado el planeta nos ha brindado la posibilidad de asistir en primera fila y de participar activamente, de manera directa, en dicho proceso y constatar la vitalidad de nuestra lengua. Tras él se esconden diversas *disciplinas lingüísticas*, entre ellas, las ya mencionadas –la *lexicología*, la *semántica*, la *morfología*, la *sintaxis*, la *fonética* y la *fonología*– todas directamente relacionadas con el estudio del lenguaje humano, entendiendo este como lenguaje verbal, es decir, como sistema de comunicación basado en *signos lingüísticos* (*semiótica*), bien sea de manera oral o escrita. Por su parte, si miramos al individuo como ser social, varias son las disciplinas o ciencias que podemos mencionar: la *etnolingüística* y la *antropología lingüística* (lenguaje y cultura), la *sociolingüística* (lenguaje y sociedad), la *dialectología* (lenguaje y variación geográfica), la *pragmática* (el hablante y su entorno) y el *análisis del discurso* (el lenguaje en uso). Asimismo, si nos introducimos en el ámbito anatómico-neuronal-psicológico, accederemos al ámbito de la *neurolingüística* (anatomía del lenguaje) y la *psicolingüística* (psicología y lingüística). A ellas cabe sumar otras disciplinas aplicadas, como la *lexicografía* (elaboración y análisis crítico de diccionarios), o multidisciplinares, como la *traductología*. Todas ellas han interferido de una manera u otra en dicho proceso, pues todas giran en torno al ser humano y a su capacidad de comunicarse con los demás.

Mucho se ha escrito en los últimos tiempos sobre el tema, como no podría ser de otra manera, pues los acontecimientos invitaban al análisis lingüístico y filológico. En este sentido, estas páginas solo suponen una reflexión más, pensada para acercar al lector más alejado del ámbito de la lingüística a esta interesante rama del saber, en este caso, a la *neología*, como proceso, en sus distintas manifestaciones (social, funcional y tecnológica), y a la *terminología*, en cuanto disciplina científica, dentro del ámbito de las ciencias humanas y sociales[61].

BIBLIOGRAFÍA

ALLAN, K. (2001), *Natural Language Semantics*. Oxford/Malden, USA, Blackwell.

ÁVILA MARTÍN, C. (2011), El léxico en los diccionarios jurídicos del español. Tonos. Revista electrónica de estudios filológicos, 21. https://www.um.es/tonosdigital/znum21/secciones/estudios-3-lexico.htm [consulta 27/05/2022].

AZORÍN FERNÁNDEZ, D. (2009), Las *marcas de uso* en los diccionarios monolingües destinados a la enseñanza de ELE. En: Vera Luján, A. y Martínez Martínez, I., *XX Congreso Internacional de la Asociación*

60. Téngase en cuenta que, en la actualidad, el dinamismo de nuestra sociedad impulsa el nacimiento constante de términos para designar nuevas realidades. Por este motivo, es muy probable que, para el momento en que se publique el presente trabajo, ya se hayan incorporado a los diccionarios algunas voces que se tratan aquí; especialmente al *Diccionario de la lengua española* (DLE), dado que la institución académica suele dar un espacio cada año a las novedades y actualizaciones en su versión digital.

61. Para un análisis más discursivo e ideológico, *cf*. Paredes García y Sánchez-Prieto Borja (2021). Para seguir tomando conciencia de la increíble capacidad creativa del hablante y de la «desbordante imaginación colectiva», *cf*. Castro (2020).

para la Enseñanza del Español como Lengua Extranjera (ASELE). Fundación Comillas, 249-267.

CABRÉ, M. T. (2009), Technologie et terminologie: changement méthodologiques et épistémologiques. Cahier de Lexicologie 94 (1): 31-56.

CASTILLO CARBALLO, M.ª A. (2015), *De la investigación fraseología a las decisiones fraseología. Un estudio de interrelaciones*. Vigo: Editorial Academia del Hispanismo.

CASTRO, X. (2020), Sinfinamiento, cuarentenials... El neoléxico de la pandemia. Archiletras, 8: 32-38. También en: https://www.archiletras.com/lexico-profesional/neolexico-pandemia/

CORPAS PASTOR, G. (1996), *Manual de fraseología española*. Madrid: Gredos.

COSERIU, E. (1977), *Principios de semántica estructural*. Madrid: Gredos.

GUERRERO RAMOS, G. (2013), El préstamo lingüístico, uno de los principales procedimientos de creación neológica. Quaderns de Filologia. Estudis lingüístics 18: 115-130.

MARTÍ SÁNCHEZ, M. (2004), La compleja identidad del léxico jurídico. Estudios de Lingüística 18: 169-189.

NAVARRO, F. A. (1997), *Traducción y lenguaje en medicina*, Fundación Dr. Antonio Esteve, Barcelona: Ediciones Doyma, S.A.

NAVARRO, F. A. (2000), *Diccionario crítico de dudas inglés-español de medicina* Madrid: McGraw-Hill•Interamericana (2013³ primera versión electrónica 3.01) *Diccionario de dudas y dificultades de traducción del inglés médico* (Libro rojo) (2022 versión electrónica 4.01: https://www.cosnautas.com/es/catalogo/diccionario-medico-librorojo).

NAVARRO, F. A. (2020), La COVID-19 y el lenguaje médico. Revista española de cardiología 73(10): 790-791.

NAVARRO, F. A. (2021a), Cómo hablar y escribir bien sobre la pandemia coronavírica: las dudas básicas. En: https://www.agenciasinc.es/Opinion/Como-hablar-y-escribir-bien-sobre-la-pandemia-coronavirica-las-dudas-basicas

NAVARRO, F. A. (2021b), Cómo hablar y escribir bien sobre la pandemia coronavírica: nivel avanzado. En: https://www.agenciasinc.es/Opinion/Como-hablar-y-escribir-bien-sobre-la-pandemia-coronavirica-nivel-avanzado

NOYA GALLARDO, C. (1995), Los «falsos amigos» y los calcos en las traducciones de terminologías específicas. En: Rafael Martín-Gaitero (ed.), *Actas de los V Encuentros Complutenses en torno a la Traducción*, Madrid: Editorial Complutense, 589-594.

PAREDES GARCÍA, F. Y SÁNCHEZ-PRIETO BORJA, P. (2021), Lengua y discurso en torno a la COVID-19. Revista de Investigación y Educación en Ciencias de la Salud 6/1. DOI: https://doi.org/10.37536/RIECS.2021.6.1.262

RAE/ASALE (2005), *Diccionario panhispánico de dudas*. Madrid: Espasa. Versión electrónica https://www.rae.es/dpd/

RAE/ASALE (2010), *Ortografía de la lengua española*. Madrid: Espasa.

RAE/ASALE (2010), *Nueva gramática de la lengua española. Manual*. Madrid: Espasa.

RAE/ASALE (2020), *Crónica de la lengua española 2020*. Madrid: Espasa.

RAE/ASALE (2021), *Diccionario de la lengua española* (*DLE*), versión electrónica 23.5. https://dle.rae.es/

RAE/ASALE (2013, 2019, 2021), *Diccionario histórico de la lengua española*, versión electrónica https://www.rae.es/dhle/

RANM (2011), *Diccionario de términos médicos*. Versión electrónica https://dtme.ranm.es/index.aspx

TAREK SHABAN MOHAMAMAD SALEM (2021), Detección y análisis de los neologismos fraseológicos referentes al coronavirus en español. El caso de las colocaciones de la COVID-19. Egyptian Journals 46 (98): 105-133, Article17;https://journals.ekb.eg/article_233296_0.html DOI: https://doi.org/10.21608/artzag.2022.88548.1042

RECURSOS ELECTRÓNICOS

DIARIO MÉDICO, https://www.diariomedico.com/search/node?keys=Fernando+NAvarro%2C+COVID-19

EFE: SALUD, https://efesalud.com/neocoronalexico-popular-lenguaje-coronavirus/

ENCLAVE DE CIENCIA, https://enclavedeciencia.rae.es/contenidos/inicio

Fundéu RAE, https://www.fundeu.es/

GOBIERNO DE ESPAÑA / MINISTERIO DE SANIDAD / AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS, https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%E2%80%9119/informacion-general-sobre-tests-de-diagnostico-de-covid-19/

REDACCIÓN MÉDICA, https://www.redaccionmedica.com/

SINC. La Ciencia es noticia. Opinión, https://www.agenciasinc.es/Opinion

THE CORONAVIRUS CORPUS, https://www.english-corpora.org/corona/

TREMÉDICA. Asociación Internacional de traductores y redactores de medicina y ciencias afines), https://www.tremedica.org/tremediteca/glosarios/diccionario-de-covid-19-en-es/

Capítulo VII
La evolución de la infección COVID-19 en España

José Luis de Justo Alpañés
Académico de número de la Real Academia Sevillana de Ciencias
Profesor emérito por la Universidad de Sevilla
Ingeniero laureado por la Real Academia de Ingeniería

INTRODUCCIÓN

No sé cómo me atrevo a escribir nada sobre el coronavirus, pues sí sé que lo que escriba ahora quedará seriamente cuestionado por los datos que se reciban los días próximos.

El primer caso registrado de lo que más tarde se identificaría como el nuevo coronavirus se produjo en la ciudad china de Wuhan el 17 de noviembre de 2019. La Organización Mundial de la Salud (OMS) fue alertada sobre una neumonía de causa desconocida el 31 de diciembre, cuando las autoridades sanitarias de Wuhan confirmaron 27 casos, que ellos relacionaron con un mercado.

Poco después del brote de la enfermedad, la mayoría de los países adoptaron medidas de protección, que iban desde el confinamiento de toda la población que no prestaba servicios esenciales hasta medidas más suaves, como el cierre de las instalaciones educativas.

A continuación, damos algunos datos de la Pandemia, con fecha 18 de abril de 2022. La principal fuente de información es la Johns Hopkins University (JHU).

Si nos referimos a las muertes por cada 100.000 habitantes proporcionadas por los gobiernos de los respectivos países, en cabeza está Perú, con 654 muertos, seguido por 14 países europeos, de ellos 13 del Este, con cifras entre 527 y 314; a continuación, viene Brasil, con 314 muertos por 100.000 habitantes, un país más del Este de Europa, Chile y Estados Unidos, en el puesto n.º 19 con una cifra de 301. Italia tiene 268, el Reino Unido 257 y Rusia 254. España ocupa el puesto n.º 37, con 219 muertos por 100.000 habitantes. Los casos de los países del Este de Europa están correlacionados con el insuficiente número de vacunados. Los de Brasil, Estados Unidos y Reino Unido, con el insuficiente uso de las mascarillas. España ha mejorado su posición gracias a que ocupa el 8.º lugar en lo que se refiere a la vacunación completa (86,2 %).

Con datos de Johns Hopkins University (19/4/22), el número total de contagiados oficiales era de 505.089.025 y el de muertos de 6.200.298. El dudoso honor de ser líder del *ranking*, lo ostentaba Estados Unidos, donde el número de casos era de 80.686.455 y el de fallecidos de 988.912. El primer país europeo por número de contagiados es Francia, con 27.980.729, y por fallecidos Rusia, con 366.436. En todos estos casos habría que tener en cuenta la población de los distintos países.

1. EVOLUCIÓN DE LA PANDEMIA EN ESPAÑA

A pesar de los precedentes de COVID-19 en China, donde se tomaron medidas a partir del 23 de enero de 2020, e Italia y Corea del Sur, donde se tomaron medidas a partir del 21 de febrero, en España fueron permitidas por el Gobierno y alentadas por algunos partidos políticos, las 50 manifestaciones masivas del Día Internacional de la Mujer, el 8 de marzo, en las que solo en Madrid participaron 120.000 personas. En estas manifestaciones masivas la mayoría de los participantes no guardaron distancia de seguridad ni llevaron mascarillas como muestran las fotos publicadas por la prensa. Pocos días después, varias ministras que participaron estaban enfermas de COVID-19.

Se produjo un cierre general de todos los centros educativos a partir del 13 de marzo de 2020. El 14 de marzo, el parlamento español aprobó el Estado de Alarma (Gobierno de España 2020a) considerado en la Constitución española para casos especialmente graves, y la Orden de 16 de marzo (Gobierno de España 2020b), que implicaba la prohibición de que los ciudadanos de terceros países en general cruzaran las fronteras de España. Además, evolucionó hacia el confinamiento de la población en sus casas, con la excepción de los trabajadores pertenecientes a los servicios esenciales. Este estado se prorrogó el 8 de mayo de 2020 (Gobierno de España 2020c). El confinamiento se fue levantando progresivamente por motivos económicos y sociales, pero el 25/10/20, cuando se estaba llegando al máximo de la 2.ª ola, toda España quedó bajo el toque de queda.

2. ESTUDIO CRÍTICO DE LOS DATOS PROPORCIONADOS POR EL GOBIERNO ESPAÑOL Y LAS AUTONOMÍAS

En España, los datos sanitarios de la COVID-19 son facilitados, desde principios de marzo de 2020, diariamente al Ministerio de Sanidad por las 17 Comunidades y las 2 ciudades autónomas.

El Ministerio de Sanidad ha venido facilitando los datos de forma confusa. Así, no facilita los datos los sábados y domingos, que vienen englobados en los del lunes. Los datos totales de curados se han detenido en el 21 de mayo de 2020, con un valor de 150.376, lo que impide calcular los activos (contagiados-fallecidos-curados) a partir de esta fecha, desde la que solo facilitan casos detectados por PCR o pruebas de antígenos. Hemos obtenido los datos diarios de RTVE.es, por ser más sencillo para nosotros.

2.1. Contagiados oficiales

Es interesante examinar el número de personas infectadas, curadas y muertas en relación con la evolución del confinamiento. El período de incubación de la COVID-19, que es el tiempo que transcurre entre el contagio y la aparición de los síntomas, es de una media de 5-6 días, aunque puede llegar a ser de hasta 14 días (OMS 2020). Es necesario tener en cuenta el retraso de las medidas en la producción de efectos, debido al tiempo necesario para que el contagio se manifieste en síntomas.

Comenzaremos con los datos proporcionados a nivel nacional y, seguiremos con los datos de Andalucía y Sevilla. La pandemia ha tenido, hasta ahora, seis olas, cuyos contagiados oficiales se muestran en la figura 1 para toda España y en la figura 2 para la Provincia de Sevilla. Vemos en ambas figuras que el máximo de la 6.ª ola ya se ha sobrepasado.

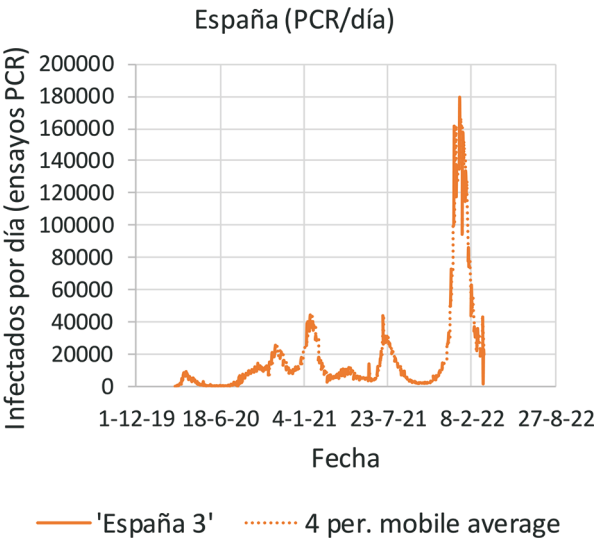


Figura 1. Infectados oficiales en España, determinados por ensayos PCR o pruebas de antígenos

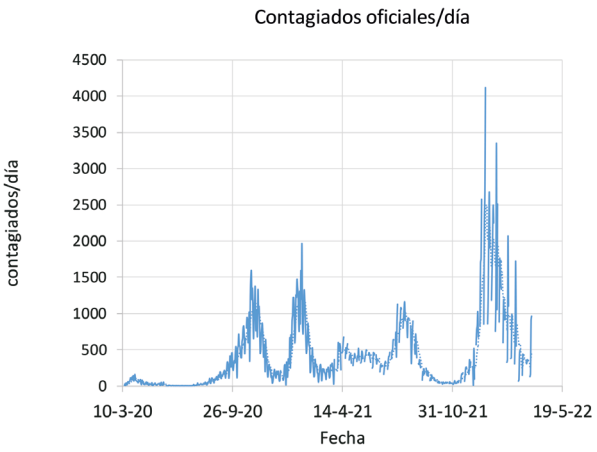


Figura 2. Contagiados oficiales/día para la provincia de Sevilla, determinados en cualquier prueba

Es interesante comenzar con los datos oficiales que nos dan los Gobiernos, para poder comparar unos países con otros. Más adelante pasaremos a los datos reales.

Los máximos, mínimos y causas se precisan en la tabla 1 para las tres primeras olas y en la tabla 2 para las tres últimas. Cada disminución de los contagios se ha conseguido a base de aumentar las restricciones (toque de queda, reducción del horario de los comercios, confinamientos perimetrales), con gran daño para la Economía.

En las tres primeras olas, el máximo de cada ola es muy superior al de las anteriores. El máximo de la 2.ª ola se produce a finales de octubre de 2020 y el de la 3.ª a finales de enero. El descenso de la 3.ª ola enlazó con una 4.ª ola de menor importancia respecto de las dos anteriores, en abril de 2021, seguida de una quinta ola, de importancia semejante a la 3.ª en el conjunto de España, en el verano de 2021. En el invierno de 2021 aparece una sexta

Tabla 1. Contagiados oficiales por día en las tres primeras olas de la pandemia

Ámbito	1.ª ola			2.ª ola		3.ª ola	
Causa	Medidas efectivas no tomadas hasta el 16/3/20 (confinamiento). Máximo al final del período de cuarentena (14 días) tras confinamiento			Levantamiento progresivo de las restricciones, aumento de las pruebas y relajación de la población en verano de 2020		Relajación de la Navidad de 2020 en fiestas familiares y sociales	
	Inicial	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.
España PDIA	83 4/3/20	9.222 30/3/20	167 7/6/20	25.595 29/10/20	7.995 9/12/20	44.357 20/1/21	2.662 1/3/21
Andalucía PDIA	1 26/2/20	723 29/3/20	0 22/4/20	5.622 30/10/20	366 8/12/20	7.899 29/1/21	138 29/3/21
Sevilla Totales	5 13/3/20	156 1/4/20	0 28/5/20	1.583 30/10/20	14 1/1/21	1.961 30/1/21	28 29/3/21

Tabla 2. Contagiados oficiales por día en las tres últimas olas de la pandemia

Ámbito	4.ª ola		5.ª ola		6.ª ola	
Causa	La llegada de la primavera de 2021 aumenta las concentraciones de personas		El Consejo de Ministros aprueba la nueva norma que permite ir a partir del 26 de junio con la cara descubierta en exteriores, siempre que se respete la distancia de 1,5 metros. La gente no respeta esta distancia		Llegada de la variante ómicron a finales de noviembre	
	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Final
España PDIA	11.731 22/4/21	3.432 14/6/21	43.960 12/7/21	1.801 4/10/21	179.125 11/1/22	19.849 10/3/22
Andalucía PDIA	2.590 7/4/21	1.096 28/6/21	5.721 22/7/21	169 2/11/21	17.548 19/1/21	5.129 24/3/21
Sevilla Totales	673 16/4/21	160 28/6/21	1.154 5/8/21	19 1/11/21	4.118 30/12/21	961 24/3/22

ola con un elevado número de contagios, que llega hasta cuadruplicar los de la ola anterior en España. Ya se ha alcanzado el máximo de la 6.ª ola en todos los ámbitos.

A partir de la 3.ª semana de marzo de 2022, el Ministerio de Sanidad solo facilita dos datos por semana, el martes y el viernes. Por este motivo ya no es posible suministrar los datos diarios, sino solo los semanales, que son de 75.913 contagiados en la semana anterior al 7/4/22 para España (última semana de la que se disponen datos).

3. LAS PRUEBAS DE SEROPREVALENCIA

El Instituto de Salud Pública Carlos III (2020) ha realizado cuatro estudios de seroprevalencia, en los que se tomaron muestras de sangre a un número de participantes que oscilaba entre 50.000 y 70.000, que representan todos los grupos de edad, sexo y ubicación geográfica, para determinar cuántas personas habían desarrollado anticuerpos después de la exposición al SARS-CoV-2. Estos estudios nos sirven, entre otras cosas, para saber cuántas personas han contraído la COVID-19 en realidad.

Las fechas centrales de las tres primeras rondas fueron el 4 de abril, el 25 de mayo y el 15 de junio de 2020. La prevalencia estimada de anticuerpos IgG frente a SARS-CoV-2 en el ámbito de España ha sido de un 5,0 % en la 1.ª ronda, y de 5,2 % en las rondas 2.ª y 3.ª. Dada la proximidad de las tres cifras y fechas, pensamos que se podría simplificar admitiendo que el 15 de junio de 2020 el número de contagiados era del 5,2 %. Del mismo modo, en Andalucía, los tres estudios dieron porcentajes del 2,6, 2,9 y 3 %, y en Sevilla del 2,3, 2,7 y 2,7 %.

Para simplificar, hemos tomado en los tres casos los resultados del 15 de junio de 2020, resumidos en la tabla 3.

Tabla 3. Contagiados oficiales y reales en los ámbitos de España, Andalucía y Sevilla

Ámbito	Población 2020	Ronda	Contagiados %	Fecha	Contagiados reales	Contagiados oficiales	Contagiados reales/oficiales
España	47.351.567	1.ª a 3.ª	5,2	t_3 = 15/6/20	c_{r3} = 2.461.281	c_{03} = 244.328	10,1
		4.ª	9,9	t_4 = 23/11/20	c_{r4} = 4.687.805	c_{04} = 1.594.844	2,9
Andalucía	8.460.261	1.ª a 3.ª	3	15/6/20	253.808	17.664	14,4
		4.ª	7,1	23/11/20	600.679	226.663	2,7
Sevilla	1.957.197	1.ª a 3.ª	2,7	15/6/20	52.844	3.167	16,7
		4.ª	9,9	23/11/20	193.763	53.908	3,6

La 4.ª ronda corresponde a la fecha del 23/11/20, y en ella disminuye notablemente el cociente entre contagiados reales y oficiales. En la 4.ª ronda los porcentajes de contagiados aumentan notablemente, según se indica también en la tabla 3.

En la tabla 3 se indican los números de contagiados reales, deducidos de estos estudios de seroprevalencia y los contagiados oficiales suministrados por el Ministerio de Sanidad (por ensayos PCR) y por el Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía (por pruebas totales). Vemos que el 15/6, para estimar los contagiados reales, había que multiplicar los datos oficiales por 10,1, 14,4 y 16,7 respectivamente. Sin embargo, el 23 de noviembre los factores eran solo de 2,9, 2,7 y 3,6 respectivamente. Esto es una consecuencia del aumento del número de pruebas, que van haciendo los datos oficiales cada vez más creíbles.

4. UN MÉTODO PARA HALLAR LOS CONTAGIADOS REALES BASÁNDONOS EN LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SEROPREVALENCIA

Hemos ideado un método para hallar los contagiados reales en función de los oficiales. Llamemos c_o al número oficial de contagiados y c_r al número real, y t, a los tiempos correspondientes, añadiendo los subíndices 3 o 4 según que se trate del final de la tercera ronda o de la cuarta.

Hasta llegar al tiempo t_3 (15 de junio), hasta el que hemos extendido las tres primeras rondas de los estudios de prevalencia, el número de contagiados reales, será:

$$c_r = c_o \cdot c_{r3}/c_{03} \qquad (1)$$

Entre las fechas de los estudios de prevalencia 3 y 4, los contagiados reales serán:

$$c_r = c_{r3} + \frac{c_{r4} - c_{r3}}{c_{04} - c_{03}} \cdot (c_o - c_{03}) \qquad (2)$$

Por último, más allá del tiempo t4 (23 de noviembre), final de la 4.ª ronda del estudio de prevalencia, será:

$$c_r = c_o \cdot c_{r4}/ c_{04} \qquad (3)$$

La formulación para hallar de modo continuo el número de contagiados reales en función de los oficiales, se basa en las siguientes bases:

1. En los intervalos 1.º y 3.º (t≤t3 y t≥ t4), el número de contagiados reales es proporcional al número oficial.
2. En el segundo intervalo ($t_3 \leq t \leq t_4$), como hay dos fechas extremas con muy distintas proporciones entre los contagiados reales y los oficiales, el incremento de contagiados reales dividido por el incremento de contagiados oficiales es independiente del tiempo.

De este modo se obtiene el gráfico de la figura 3.

En lo sucesivo indicaremos cuando los datos son los oficiales o los datos reales.

La pendiente de la línea roja de este gráfico nos daría el número de contagiados reales por día (crd, línea roja), u obtenidos mediante pruebas PCR y de antígenos (línea azul), que alcanza su máximo el día 30/3/20 en el primer punto de inflexión, y, tras él, va disminuyendo hasta alcanzar un mínimo de 382 crd, el día 21/6, en el segundo punto de inflexión, que coincide con el final de la primera ola. A partir de esa fecha comienza a enderezarse la curva de nuevo, con el comienzo de la segunda ola, hasta alcanzar un máximo de 42.197 crd, muy superior al de la primera ola, el día 29/10, en el tercer punto de inflexión. A partir de ese máximo va disminuyendo la pendiente hasta llegar a un nuevo mínimo, el 9/12, con 23.383 crd, en el cuarto punto de inflexión que marca el final de la segunda y el principio de la tercera ola. El 20/1/21 se llega al máximo, en la tercera ola, con 130.381 crd y a un mínimo de 7.783 crd, el 1/3/21.

Estos datos se reflejan en la tabla 4 para las tres primeras olas y en la tabla 5 para las tres últimas, para España, Andalucía y Sevilla. En la 4.ª ola se alcanza un

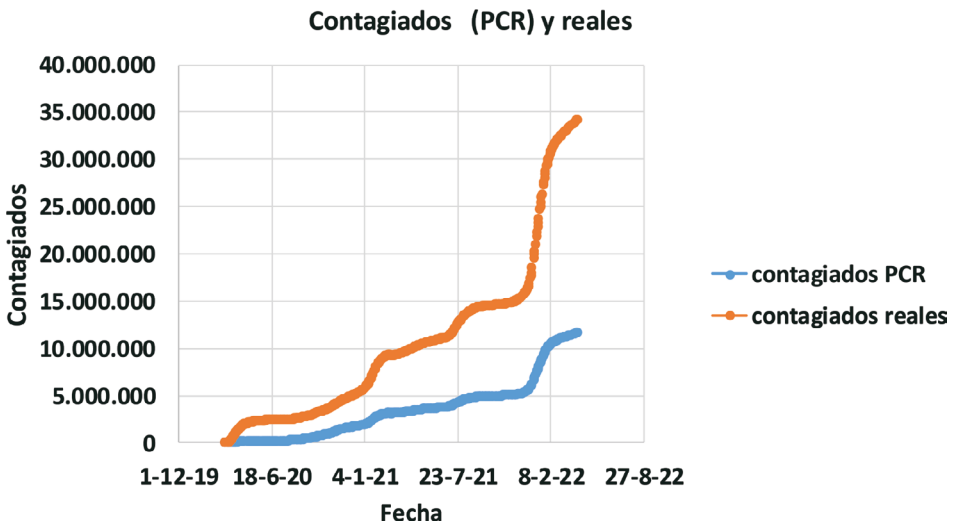


Figura 3. Contagiados por PCR y reales en España

Tabla 4. Contagiados reales por día en las tres primeras olas de la pandemia

Ámbito	1.ª ola			2.ª ola		3.ª ola	
	Inicial	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.
España PDIA	6.266 10/3/20	92.899 30/3/20	382 21/6/20	42.197 29/10/20	23.383 9/12/20	130.381 20/1/21	7.783 1/3/21
Andalucía PDIA	0 27/2/20	14.285 29/3/20	5 20/6/20	10.363 31/10/20	980 8/12/20	20.930 29/1/21	4.873 23/4/20
Sevilla Totales	83 13/3/20	2.603 1/4/20	0 30/5/20	4.396 30/10/20	50 1/1/20	7.048 30/1/20	2.078 23/4/21

Tabla 5. Contagiados reales por día en las tres últimas olas de la pandemia

Ámbito	4.ª ola		5.ª ola		6.ª ola	
	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Final
España PDIA	34.482 22/4/21	10.088 14/6/21	129.214 12/7/21	5.294 4/10/21	526.511 11/1/22	58.343 10/3/22
Andalucía Totales	6.848 7/4/21	2.910 28/6/21	15.198 22/7/21	448 2/11/21	40.979 30/12/21	13.600 24/3/22
Sevilla Totales	2.419 16/4/21	575 28/6/21	4.148 5/8/21	93 2/11/21	14.801 30/12/21	3.454 24/3/22

máximo de 34.482 crd, en España, el 22/4/21 y un mínimo de 10.088 crd el 14/6/21.

En la 6.ª ola se alcanza el máximo absoluto de contagiados reales con 526.511 crd en España, el 11/1/22, 40.979 crd en Andalucía y 14.801 crd en Sevilla, en ambos casos el 30/12/21. Se ha sobrepasado ya claramente el máximo.

A partir de la 3.ª semana de marzo de 2022, el Ministerio de Sanidad solo facilita dos datos por semana, el martes y el viernes. Por este motivo ya no es posible suministrar los datos diarios, sino solo los semanales, que son de 223.135 contagiados en la semana anterior para España al 7/4/22 (última semana de la que se disponen datos).

La pendiente que van alcanzando las curvas de la figura 3 indica un valor estable del número de contagiados por día.

Las figuras 4 y 5 muestran el número real de contagiados por día en España y Sevilla respectivamente. Vemos como, en ambos casos y también en Andalucía, el número de contagiados por día se va reduciendo de forma ostensible día a día.

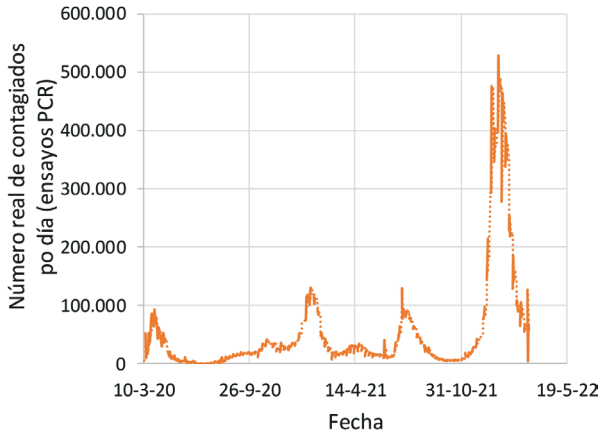


Figura 4. Número real de contagiados por día en España

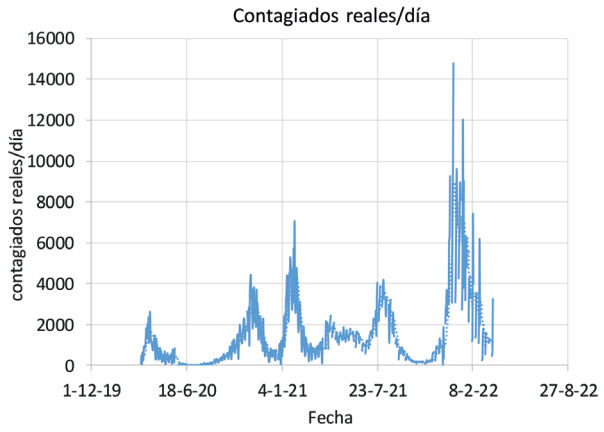


Figura 5. Contagiados reales por día en Sevilla

Hay que destacar que, con fecha 13 de enero de 2022, más del 60 % de la población de España, 28 394 734 personas, se había contagiado con la COVID-19.

5. NÚMERO REAL DE FALLECIDOS

El 25 de mayo de 2020, el Ministerio de Sanidad dio una cifra de 27.117 fallecidos.

En España y en todos los países hay otras formas de calcular el número de muertes durante una pandemia:

1. Como el exceso de mortalidad durante la pandemia en comparación con los años anteriores. El Instituto Nacional de Estadística ofreció una cifra de 43.945 muertes el 24 de mayo.
2. El Sistema de Monitoreo de Mortalidad Diaria que dio una cifra de 43.340.
3. La Asociación Española de Profesionales de Servicios Funerarios, que dio una cifra de 43.985 muertos con fecha 25 de mayo.

Estos tres métodos igualmente confiables nos dan un promedio de 43.757 muertes.

Esto indica que habría que multiplicar las cifras dadas por el Gobierno por 1,61 para encontrar las cifras reales.

Por otro lado, el Ministerio de Sanidad dio para todo 2020, una cifra de 50.837 fallecidos, pero el exceso, según el INE, fue de 75.073 fallecidos. Esto nos daría un coeficiente de 1,48. Es lógico que, a medida que aumenta el tiempo, el Ministerio de Sanidad aprenda mejor a calcular el número de fallecidos por coronavirus, y, por tanto. disminuya el coeficiente.

Estos dos resultados se han recopilado en la tabla 6.

Tabla 6. Números oficial y real de fallecidos

Fecha	Muertos reales	Muertos oficiales	Muertos reales/ muertos oficiales	Fuente
25/5/20	43.757	27.117	1,61	Varias
31/12/20	75.073	50.837	1,48	INE

Existen otras tres fechas, 21 de octubre, 10 de noviembre y 30 de noviembre, en las que tenemos cifras del número oficial y el real de fallecidos. Facilitadas respectivamente por los Servicios Funerarios y el INE. Las tres nos dan un coeficiente muy parecido al de la fecha 25 de mayo, pero nos ha parecido más fiable el dato del INE para todo 2020. En los cálculos que hemos realizado posteriormente para averiguar el número de muertos reales, hemos tenido en cuenta la variación de la tabla 6, utilizando un mismo método que hemos detallado en el apartado de pruebas serológicas.

La empresa Inverence, y basándose en el Big Data, con fecha 15/4/20 nos da un coeficiente multiplicador para Andalucía de 1,49. Esta cifra se basa en la interpretación por parte del Instituto de Salud Carlos III del sistema de Monitorización de la Mortalidad Diaria (MOMO) y de los certificados dados por los registros provinciales de defunción. Tomaremos la misma cifra para Sevilla.

Las tablas 7 y 8 muestran el número real de fallecidos por día en España, Andalucía y Sevilla, en las tres primeras olas y en las tres últimas respectivamente.

Hemos pasado de los fallecidos oficiales a los reales por el procedimiento indicado anteriormente para los contagiados.

La figura 6 muestra el número de fallecidos reales en España en función del tiempo. Vemos como el pico de fallecidos se ha alcanzado ya, claramente, y, estamos, ahora, en una disminución de esta cifra.

El máximo de fallecidos en la 1.ª ola se produce entre finales de marzo y principios de abril como el máximo de contagios. El máximo de la 2.ª ola se produce entre finales de octubre y en noviembre, y el de la 3.ª ola

Tabla 7. Número real de fallecidos diarios en España, Andalucía y Sevilla en las tres primeras olas de la pandemia

Ámbito	1.ª ola			2.ª ola		3.ª ola	
	Inicial	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.
España PDS	2 2/3/20	1530 1/4/20	2 20/6/20	865 23/11/20	238 30/12/20	1233 8/2/21	153 22/4/21
Andalucía Totales	1 15/3/20	118 26/3/20	0 28/5/20	142 9/11/20	1 1/1/21	189 11/2/21	0 10/4/21
Sevilla Totales	1 22/3/20	28 31/3/20	0 25/4/20	40 30/10/20	0 7/11/20	42 11/2/21	0 10/4/21

Tabla 8. Número real de fallecidos diarios en España, Andalucía y Sevilla en las tres últimas olas de la pandemia

Ámbito	4.ª ola		5.ª ola		6.ª ola	
	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Final
España PDS	330 10/5/21	10 8/7/21	312 30/8/21	6 18/11/21	657 31/1/22	93 10/3/22
Andalucía Totales	80 10/5/21	0 30/6/21	79 23/8/21	0 17/11/21	101 7/2/22	18 24/3/22
Sevilla Totales	19 10/5/21	0 11/7/21	27 7/9/21	0 29/10/21	27 2/2/22	6 24/3/22

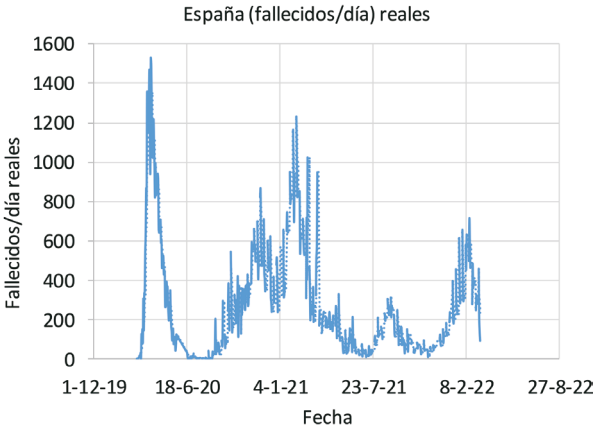


Figura 6. Número real de fallecidos en España en función del tiempo

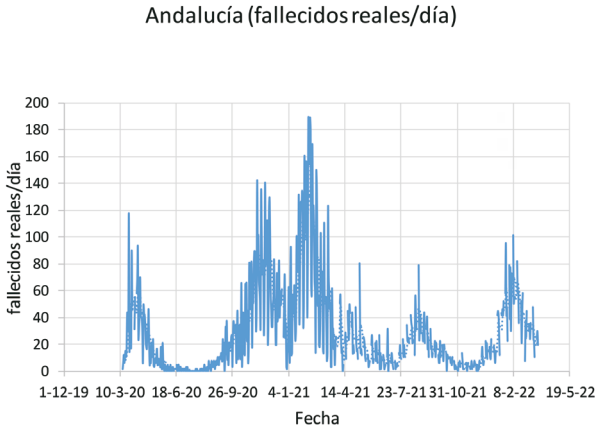


Figura 7. Fallecidos reales/día en Andalucía

a principios de febrero de 2021, con una reducción importante poco después. La 4.ª ola, de importancia algo menor, aparece en la primavera de 2021, como los contagios. La 5.ª ola aparece en el verano de 2021, algo después de los contagios. La 6.ª ola se desarrolla en el invierno de 2021 y 2022, con un número de fallecidos inferior a los de las tres primeras, debido a la extensión de la vacuna. Después del apaciguamiento del final de la 5.ª ola se está produciendo un recrudecimiento de los fallecimientos, que, en España y Andalucía supera a los de la 4.ª y 5.ª olas, pero no en Sevilla.

A partir de la 3.ª semana de marzo de 2022, el Ministerio de Sanidad solo facilita dos datos por semana, el martes y el viernes. Por este motivo ya no es posible suministrar los datos diarios, sino solo los semanales, que son de 831 en la semana anterior al 7/4/22 para España (última semana de la que se disponen datos).

La figura 7 muestra el número real de fallecidos por día en Andalucía. Vemos como el aumento del número de fallecidos en la 6.ª ola se refleja en un coeficiente inferior al de los contagiados. Se ha sobrepasado el máximo, pero aparecen repuntes frecuentes.

6. ACTIVOS

El número de activos (contagiados-fallecidos-curados) tiene una gran importancia, porque son los que nos pueden contagiar. A la hora de calcular los activos reales, el número de contagiados es incontestable en cuanto que se basa en las pruebas de seroprevalencia, pero sí hay que decir que la última prueba tiene fecha el 23/11/20, y sería deseable que se realizaran más pruebas. La última fecha que tenemos para los fallecidos reales por covid es de finales de 2020 (INE), y sería altamente deseable tener cuanto antes las de 2021. En cuanto a los curados son cifras diarias del Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía, pero dado el desmadre actual en el número de contagiados asintomáticos, nos tememos que este desmadre se pueda extender a cuando estos contagiados se curen. En cualquier caso, estamos tratando de utilizar datos de la mejor calidad posible.

La tabla 9 muestra los activos reales para España, Andalucía y Sevilla en las tres primeras olas. Solo se dispone de los datos de España para la 1.ª ola.

El máximo número de activos en la 1.ª ola se produce en mayo de 2020, el máximo de la 2.ª ola se produce hacia finales de 2020, y el máximo de la 3.ª ola en primavera de 2021. En todos los casos, bastante después del máximo de contagiados.

La tabla 10 muestra lo mismo, en las tres últimas olas, para Andalucía y Sevilla, porque, como ya se ha explicado anteriormente, no se dispone de los datos de España. El máximo de la 4.ª ola se produce también en la primavera de 2021 y el de la 5.ª ola al final del verano. En todos los casos después del máximo de contagios. Ni en Andalucía ni en Sevilla se ha alcanzado ya el máximo de activos. Hay que tener en cuenta que estamos operando con el número de contagiados y fallecidos reales, pero con los curados oficiales.

La figura 8 muestra los activos reales en Andalucía. Como puede verse en la figura o en la tabla, apenas hay bajada del número de activos en la 1.ª ola. En realidad, el número de activos prácticamente crece desde el principio hasta el final, con pequeñas bajadas. Sin embargo, la curvatura del gráfico indica su llegada al máximo al final de la sexta ola, pero de nuevo se presenta un repunte importante.

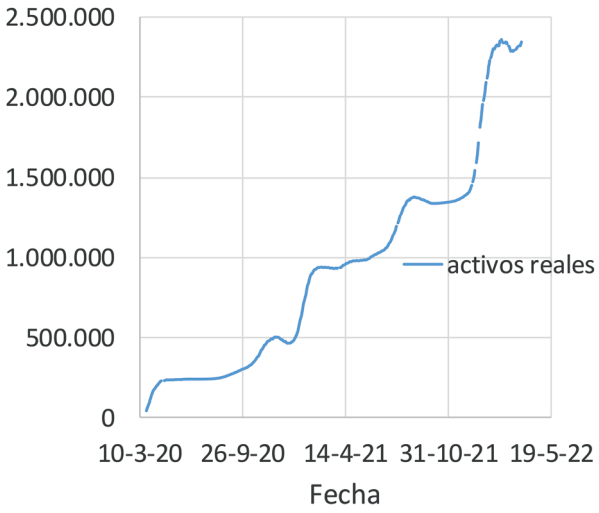


Figura 8. Activos reales en Andalucía (infectados-curados-fallecidos) totales

Tabla 9. Activos reales para España, Andalucía y Sevilla en las tres primeras olas

Ámbito	1.ª ola			2.ª ola		3.ª ola	
	Inicial	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.
España PDS	10.700 9/3/20	2.336.036 20/5/20	2.203.574 21/5/20				
Andalucía Totales	38.594 22/3/20	232.533 2/5/20	232.023 3/5/20	499.949 2/12/20	462.039 22/12/20	938.524 6/3/21	930.493 23/3/21
Sevilla	33.440 11/4/20	49.605 23/5/20	49.266 1/6/20	171.409 25/11/20	159.655 22/12/20	303.086 2/4/21	302.416 4/4/21

Tabla 10. Activos reales para Andalucía y Sevilla en las tres últimas olas

Ámbito	4.ª ola		5.ª ola		6.ª ola	
	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Final
Andalucía Totales	973.243 23/4/21	972.629 25/4/21	1.378.981 27/8/21	1.338.172 5/10/21	2.379.208 7/4/22	2.379.208 7/4/22
Sevilla Totales	49.605 23/5/20	49.266 1/6/20	466.531 5/9/21	464794 8/9/21	761.316 7/4/22	761.316 7/4/22

Mientras el número de personas que puede contagiar (los activos) no baje de forma importante, la pandemia seguirá creciendo. Se lo podemos agradecer a los negacionistas, que no se vacunan, como Miguel Bosé; parece que a Novak Djokovic el triunfo de Nadal (vacunado) le ha hecho cambiar de opinión. También a los insolidarios, que prefieren un rato de diversión, aunque esto suponga la muerte de personas. Es el reflejo de una parte de la sociedad sin principios.

7. COMPARACIÓN DE CURADOS Y FALLECIDOS

La tabla 11 nos sirve para comparar el número de personas curadas y fallecidas en España, Andalucía y Sevilla.

La población de España es de 47,3 millones de habitantes, la de Andalucía 8,5 millones y la de la provincia de Sevilla 1,95 millones, por lo que la tabla muestra que, en proporción a su población, los datos sanitarios de Sevilla y Andalucía son mejores que los de toda España. La gran proporción entre curados y muertos, además creciente con el tiempo, es un éxito de los servicios sanitarios.

8. LA LETALIDAD DEL SARS-COV-2

Existen varias definiciones posibles de letalidad, pero nosotros hemos escogido la *letalidad diaria* como el cociente entre las personas que fallecen cada día, dividido por el número de activos (contagiados-fallecidos-curados) que hay en ese día, que son los que pueden fallecer de COVID-19. De esta forma podemos ver la evolución de la letalidad en función del tiempo. El método más simple para caracterizar la propagación de un virus en una población de millones de personas es mediante una progresión geométrica, cuyos términos corresponden a días sucesivos. Desde ahora en adelante cuando hablemos de letalidad nos referimos a la letalidad diaria.

Para estudiar su evolución tenemos varias dificultades. En primer lugar, el número de muertos diarios da saltos que hacen ininteligibles los gráficos. Par evitar esto hemos considerado, cada día la media de los días que envuelven el elegido (entre 3 y 5 días). En segundo lugar, por lo que respecta a España, el Ministerio de Sanidad dejó de dar los datos de curados (indispensable para hallar los activos) a partir del 21 de mayo por lo cual el estudio solo puede llegar hasta esa fecha.

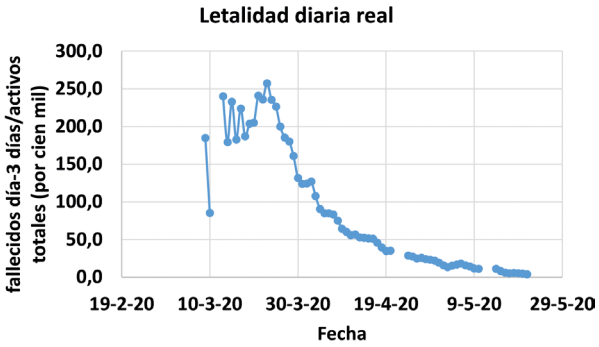


Figura 9. Letalidad diaria, real en España

De esta forma obtenemos el gráfico de la figura 9, con datos reales de fallecidos y de activos obtenidos con cualquier prueba.

La tabla 12 muestra estos mismos datos de modo numérico.

Tabla 12. Letalidad del SARS-CoV-2 en España

Fecha	Letalidad diaria (tanto por cien mil)	Tendencia	Circunstancias
9/3/20	136	Comienzo	
13/3/20 al 28/3/20	211	Máximo	Primeras restricciones efectivas 1.ª ola el 16/3/20
21/5/20	3,7	mínimo	Final 1.ª ola 21/5/20

Tabla 11. Comparación de curados y fallecidos

Ámbito	21/5/20			Máximo			
	Curados	Muertos reales	Curados/ muertos	Curados	Muertos reales	Curados/ muertos	Muertos/ población
España	150.376	43.250	3,5		152.258 7/4/22		0,32 %
Andalucía	11.812	2.052	5,8	1.371.190	19.981 7/4/22	68,6	0,24 %
Sevilla	2.109	417	5,1	281.028	4.202 7/4/22	66,9	0,22 %

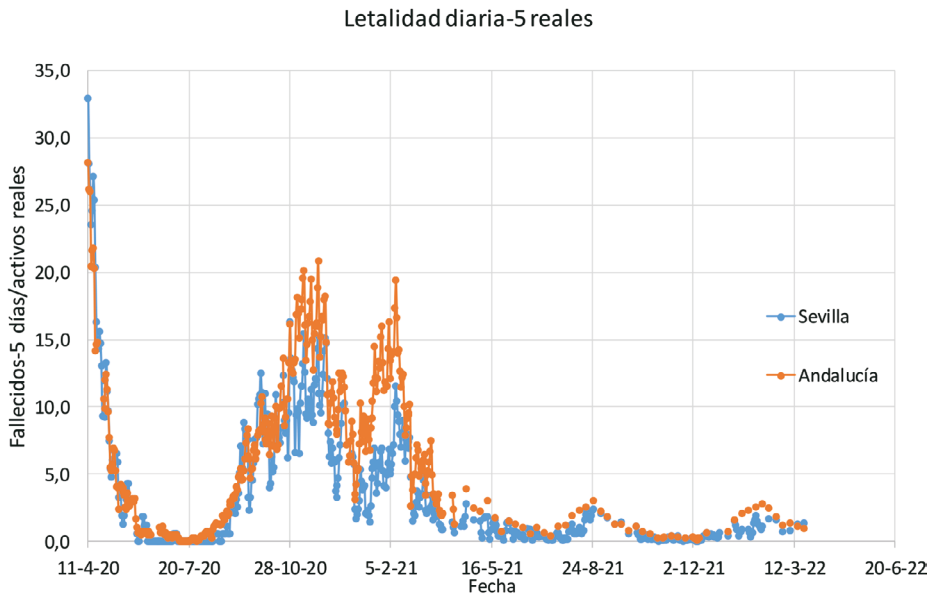


Figura 10. Letalidad diaria por cien mil en Sevilla y Andalucía

Los dos primeros datos son algo dispersos, debido al escaso número de fallecidos (20 y 14 respectivamente), pero sí podríamos decir que partiendo de una letalidad diaria del 136 por cien mil llegamos hasta un máximo de 211 por cien mil en marzo. Hay que decir que las primeras restricciones efectivas de la primera ola se empiezan a aplicar el 16 de marzo. Como consecuencia de ellas, desde el 28 de marzo se produce un descenso continuo de la letalidad hasta llegar a un mínimo del 3,7 por cien mil el 21 de mayo, fecha en la que terminan los datos facilitados por el Ministerio de Sanidad.

La figura 10 muestra, reunidos en un mismo gráfico, los datos de Andalucía y Sevilla.

Los datos de Sevilla están casi siempre ligeramente por debajo de los de Andalucía. Se observa una fuerte dispersión, debido a la variabilidad diaria del número de fallecidos, a pesar de haberlos promediado en grupos de 5. En las tabla 13 se indican las tendencias.

A partir de la 2.ª semana de febrero, la Junta de Andalucía deja de suministrar datos los sábados. Con ello deja de haber datos consecutivos de 5 días y no podemos continuar con la secuencia seguida hasta entonces. Lo que se ha hecho es utilizar la secuencia de cuatro días consecutivos y hallar los fallecidos reales dividido por la actividad en el 2.º día de la serie de cuatro. Los altos valores de letalidad iniciales obedecen a la falta de equipamiento y desorganización inicial. Vemos, por otro lado, que la máxima letalidad suele coincidir con los máximos de las distintas olas, los que también puede obedecer al descontrol y escasez de medios que se produce con estas olas.

Por lo que respecta a la influencia de las distintas variantes, podemos decir lo siguiente: La variante β, también llamada variante sudafricana, se detectó en octubre de 2020, y ha podido contribuir al máximo de letalidad, que se produce en octubre-noviembre de este año. La variante γ, también llamada variante brasileña, aparece en enero de 2021, y podría haber contribuido al máximo de letalidad que se produce en febrero. La variante δ está ya bien establecida en España en julio de 2021, lo que podría contribuir al máximo de finales de agosto. La variante ómicron aparece en España en la primera semana de diciembre de 2021, empieza a ser mayoritaria en la semana del 13 al 18, y en la 1.ª semana de enero ya es claramente mayoritaria (86,5 %). Con anterioridad predomina la variante δ.

Tabla 13. Tendencias en la letalidad diaria en Andalucía y Sevilla

	Inicial	Min.	Max.	Min,	Max.	Min.	Max.	Min.	Final
Andalucía	28,2 11/4/20	0 13/7/20	20,9 25/11/20	3,1 1/1/21	19,4 10/2/21	0,4 14/7/21	3 25/8/21	0,1 6/12/21	1 22/3/22
Sevilla	33 11/4/20	0,5 11/6/20	16,2 28/10/20	1,4 15/1/21	11,4 15/2/21	0,1 15/7/21	2,2 1/9/21	0,0 29/10/21	1,4 22/3/22
Ola	Max. 1.ª	Min. 1.ª	Max. 2.ª	2.ª a 3.ª	Max. 3.ª	4.ª a 5.ª	Max. 5.ª	Min. 5.ª	Max. 6.ª

9. LA GRIPALIZACIÓN DE LA COVID-19

La forma más frecuente de caracterizar la propagación de un virus en una población de millones de personas es mediante una progresión geométrica con intervalo de días.

Olvidándose de los miles de personas que están investigando el SARS-CoV-2, el Ministerio de Sanidad ha venido facilitando los datos para España de forma confusa. Así, no ha facilitado los datos los sábado y domingo, que venían englobados en los del lunes, lo que no permitía facilitar los datos diarios en estos dos días de la semana. Los datos totales de curados se han detenido en el 21 de mayo de 2020, con un valor de 150.376, lo que impide calcular los activos (contagiados-fallecidos-curados) a partir de esta fecha, desde la que solo facilitan casos detectados por PCR o pruebas de antígenos. Pero, además, a partir de la semana del 14 de marzo de 2022, solo han facilitado los datos dos días por semana: martes y jueves, con lo que, desde esta semana solo se conocen los datos semanales. Los últimos datos suministrados han sido los del 7/4/22: ¡ojos que no ven corazón que no siente!

La Junta de Andalucía, a través del Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía, ha venido facilitando, desde el principio los datos de lunes a sábado (el dato del sábado con retraso), ha facilitado, además los datos detectados por otros tipos de prueba (por ejemplo, pruebas serológicas) y ha suministrado el de curados, lo que permite calcular los activos, que son los que pueden contagiar la enfermedad. Pero, a partir del mes de marzo, ha dejado de facilitar los datos del sábado, y, a partir de la última semana de marzo se ha unido al Ministerio de Sanidad, facilitando solo los datos dos días por semana: martes y jueves, con lo que, desde esta semana solo se conocen los datos semanales. Los últimos datos suministrados han sido también los del 7/4/22.

Se podría esperar que esto se debe al descenso del número de contagios y de fallecidos, pero, esto no está demostrado. La tabla 14 muestra los contagiados y fallecidos reales en España en las últimas 5 semanas. En anteriores números de este periódico hemos indicado como se puede pasar del número de casos oficiales al de casos reales.

La tendencia que se observa en la tabla es un aumento del número de contagiados hasta la semana que termina el 28/3/22, en la que parece que se inicia un descenso. En cuanto a los fallecidos, un aumento hasta la semana que termina el 24/3/22, y una variación errática en adelante. En Andalucía y Sevilla desde la semana que termina el 28/3/22 hasta la que termina el 7/4/22, parece que el número de contagiados reales diarios ha venido disminuyendo, con número final (7/4/22) en Andalucía de 24.284 contagiados reales/semanales. Por el contrario, el número de fallecidos reales por semana no disminuye y presenta un valor medio de 110 fallecidos reales/semana en Andalucía y 45 en Sevilla.

Tabla 14. Contagiados y fallecidos reales en la semana anterior a la fecha indicada, para España

Fecha del fin de la semana	Contagiados en la semana	Fallecidos en la semana
14/3/22	236.578	823
17/3/22	295.884	839
21/3/22	349.030	941
24/3/22	373.412	1.017
28/3/22	380.719	244
31/3/22	293.675	220
4/4/22	333.937	781
7/4/22	223.135	831

La figura 5 presenta los contagiados reales diarios en la provincia de Sevilla. Se observa un repunte importante en los datos finales, con más de 3.000 casos el 23/3 y el 24/3/22. Por otro lado, sigue creciendo el número de activos (que repito son los que pueden propagar la enfermedad, en esta provincia), que asciende a 761.316, el día 7/4/22. La figura 7 presenta los fallecidos reales en toda Andalucía: se mantienen valores residuales que no acaban de desaparecer.

10. EL ORIGEN DEL SARS-COV-2

Y para terminar, algunos comentarios sobre el origen de este virus diabólico. China tiene el mayor centro de investigación virológica en la ciudad de Wuhan, con el código P4. Esto indica el máximo nivel global de bioseguridad, que no es compartida por los diplomáticos americanos. La epidemia de COVID-19 se originó en la ciudad de Wuhan el 17 de noviembre de 2019. El Instituto de Virología de Wuhan ha desmentido la hipótesis de que el coronavirus fuera creado genéticamente y que escapó de allí o que el paciente cero sea uno de sus científicos y murió, pero algunos investigadores y funcionarios de inteligencia han indicado que el coronavirus fue creado artificialmente y han señalado posibles vínculos del Instituto de Virología de Wuhan con un programa de armas biológicas. En marzo de 2020, los máximos responsables del Instituto señalaron que ningún trabajador del mismo había dado positivo en los test de detección del SARS-CoV-2. Pero recientemente se ha hecho público que al menos tres científicos del Instituto enfermaron con síntomas compatibles de COVID-19 un mes antes del anuncio

oficial de la existencia de un nuevo coronavirus, por lo que sigue habiendo serias dudas sobre el nivel de bioseguridad del Instituto.

Por otra parte, varios destacados virólogos publicaron al comienzo de la pandemia que el SARS-CoV-2 procede de la naturaleza, debido a la diferencia entre el genoma del coronavirus y el de los virus trabajados en ese laboratorio.

Hay que añadir que China ha facilitado la cadena del genoma del virus, ya sea voluntariamente o presionada.

El biólogo francés Luc Montagnier, ganador del Premio Nobel en 2008 por su participación en el descubrimiento del virus VIH, fue el primero que sostuvo que el coronavirus que causa el COVID-19 es de origen humano. Según Montagnier, fue un desliz accidental mientras investigaban una vacuna contra él. Por esta afirmación, ha sido muy criticado.

La explicación que se da de su origen en la ciudad de Wuhan es que el coronavirus surgió en el mercado de Huanan, debido a la abundancia de especies exóticas que se vendían allí y se cocinaban en malas condiciones higiénicas. El coronavirus pudo haber venido de los murciélagos y haber mutado dentro de algún mamífero antes de propagarse a los humanos (Torres-López 2020). No se sabe con precisión dónde trabajaba el paciente cero.

Hasta un año después de la aparición del virus, una Comisión de la OMS no ha obtenido permiso para ir a la ciudad de Wuhan. Ahora están a la espera de más informes que han pedido a China.

Recientemente, la viróloga hongkonesa Li-Meng Yan (Wikipedia) ha asegurado que «la teoría del origen natural carece de apoyo sustancial». El texto está firmado por otros tres científicos. La viróloga Li-Men también ha huido a USA para refugiarse de las amenazas de muerte que recibía en China.

Su descubrimiento revelaría que el COVID-19 es un producto de laboratorio «creado utilizando los coronavirus de murciélago ZC45 y/o ZXC21 como plantilla y/o columna vertebral». «Sobre la base de la evidencia, postulamos además una ruta sintética para el SARS-CoV-2, lo que demuestra que la creación en laboratorio de este coronavirus es conveniente y se puede lograr en aproximadamente seis meses», sostienen.

En cualquier caso, la explicación del mercado de Huanan parece ser un intento de eliminar las sospechas sobre el Instituto de Virología. Las últimas teorías indican que el laboratorio de Wuhan creó ocho virus, dos muy infecciosos para el ser humano (diario *ABC*, 25/1/22). En un laboratorio BSL-2, que ocupa el penúltimo lugar en seguridad, la doctora Shi Zhengli y el zoólogo Peter Daszak manipularon genéticamente un virus similar al del SARS y le añadieron partes de otros virus de murciélago para «reproducirse bien» en células humanas y sin pasar por un animal intermedio. Aunque su experimento buscaba prevenir pandemias, muchos expertos critican este riesgo y exigen investigar una fuga accidental del Instituto de Virología de Wuhan por la opacidad del régimen chino.

El pasado 14 de mayo de 2021, un grupo de científicos de universidades como Harvard, Chicago, Toronto, Cambridge, Yale, Stanford, Berkeley y otras, publicaron una carta en la revista Science en la que solicitaban seguir estudiando el origen del SARS-CoV-2:

> Debemos tomar en serio las hipótesis sobre el origen tanto natural como de laboratorio hasta que tengamos suficientes datos. La investigación debe ser transparente, objetiva, basada en datos, que incluya una amplia experiencia, que esté sujeta a una supervisión independiente y que se gestione de manera responsable para minimizar el impacto de los conflictos de intereses. Las agencias de salud pública y los laboratorios de investigación deben abrir sus registros al público (v. López-Goñi 2021).

Los investigadores afirman que todavía son posibles tanto la hipótesis de un accidente de laboratorio en Wuhan como la del salto natural del coronavirus desde los animales (*El País*, 13 de mayo de 2021).

CONCLUSIONES

Se han presentado resultados sobre el número de personas infectadas y muertes producida por COVID-19 en diferentes países. Una forma de caracterizar la propagación de un virus en una población de millones de personas es mediante una progresión geométrica con intervalo de días. Para disminuir la tasa de la progresión, una vez que se ha establecido la infección, se han utilizado diferentes formas de disminuir el contacto entre las personas y de aislar a los infectados. Pero la mejor manera de evitar que la infección arraigue en una comunidad es poner en práctica estas medidas lo antes posible. Los países que se muestran reacios a adoptar estas medidas o que las han retrasado han sufrido mucho por la gravedad de la pandemia.

Hasta ahora se han producido seis olas de la pandemia. Aunque parece que estamos en el declive de la 6.ª ola, no se puede decir que la pandemia esté vencida ni mucho menos

Se ha demostrado la importancia de la mascarilla y de la vacunación.

Se ha presentado un informe detallado de la evolución de la pandemia en España, incluyendo métodos para pasar de los contagiados o fallecidos oficiales a los reales.

En la lucha entre dos especies: *Homo Sapiens* y *SARS-CoV-2,* se ha demostrado como muchos miembros de la especie elegida han actuado de forma egoísta y estúpida, que incluso podría empezar por la contribución a la

creación de la segunda. El *SARS-CoV-2*, un ente diabólico, ha acudido a todo tipo de mutaciones para colaborar en el empobrecimiento de la primera especie. Su arma principal ha sido tratar de impedir la comunicación del *Homo Sapiens*, que es precisamente el arma que le dio su carácter de Rey de la Creación.

BIBLIOGRAFÍA

GOBIERNO DE ESPAÑA (2020a), Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. BOE 67, de 14 de marzo de 2020, 25390-25400.

GOBIERNO DE ESPAÑA (2020b), Orden INT/239/2020, de 16 de marzo, por la que se restablecen los controles en las fronteras interiores terrestres con motivo de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. BOE 70, de 16 de marzo de 2020, 25653-25654.

GOBIERNO DE ESPAÑA (2020c), Real Decreto 514/2020, de 8 de mayo, por el que se prorroga el estado de alarma declarado por el Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. BOE 129, de 9 de mayo de 2020, 31952-31960.

INSTITUTO DE ESTADÍSTICA Y CARTOGRAFÍA DE ANDALUCÍA. Junta de Andalucía. Consejería de Salud y Familias.

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (2020), Estudio nacional de seroprevalencia. Gobierno de España.

INVERENCE. Gobierno de España.

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (JHU) OF MEDICINE. CORONAVIRUS RESOURCE CENTER. Baltimore, Maryland 21218, EE. UU.

LÓPEZ-GOÑI, I. (2021), Salió el SARS-CoV-2 de un laboratorio, 1 de junio.

RTVE.es. Página web de RTVE.

STATISTA. El portal de estadísticas para datos de mercado. Acceso a través de cada Universidad.

TORRES-LÓPEZ, J. (2020), ¿Cuál es el origen del SARS-CoV-2? Revista Médica del Instituto Mexicano de la Seguridad Social 58(1): 1-2.

Capítulo VIII

Modelos matemáticos de epidemias víricas: el caso de la COVID-19

Antonio Gómez Expósito*, José A. Rosendo Macías y Miguel A. González Cagigal
Dpto. de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Sevilla
**Académico de número de la Real Academia Sevillana de Ciencias*

INTRODUCCIÓN Y MOTIVACIÓN

TODOS LOS SERES VIVOS COMPLEJOS, y el *homo sapiens* no es una excepción, sufren enfermedades contagiosas, que en determinadas circunstancias pueden dar lugar a pandemias. Dependiendo de la naturaleza del patógeno, estas enfermedades pueden ser de origen bacteriano (lepra, cólera, tuberculosis o peste negra), parasitario (como la malaria o paludismo, que mata todos los años a casi medio millón de personas) o vírico (viruela, sarampión, gripe española, hepatitis, ébola, sida y un largo etcétera), siendo este último grupo el de mayor preocupación, al menos para las sociedades desarrolladas, desde que la introducción masiva de los antibióticos, en la segunda mitad del siglo XX, permitió mantener bajo control las seculares pandemias bacterianas de antaño.

Las pandemias han cambiado el curso de la historia casi tanto como las guerras. En el libro *The rise and fall of the third chimpanzee* (1991), el conocido divulgador y geógrafo, Jared Diamond, argumenta que la rápida extinción de los neandertales en Europa, hace unos 40 o 50 mil años, pudo deberse en gran medida a una mayor susceptibilidad hacia los patógenos (posiblemente gonorrea) introducidos por los cromañones que llegaron a Europa desde África, de forma similar a como los europeos transmitieron la viruela a los nativos americanos en el siglo XVII, causando una gran mortandad.

Antes de la Ilustración y el desarrollo de la ciencia moderna, las pandemias se consideraban un castigo divino, y como tal se combatían con plegarias y procesiones, al igual que las sequías u otras amenazas externas. Así ocurrió con la peste negra, considerada la peor pandemia de la que se tiene registros, que asoló Europa y Asia en el siglo XIV, causando posiblemente más de 100 millones de muertes. Pero incluso cuando la Medicina ya era una ciencia digna de tal nombre, y se conocían los beneficios de las cuarentenas, la humanidad siguió sufriendo graves pandemias de forma recurrente. Tal fue el caso de la lepra, enfermedad bacteriana que devastó Europa y Asia a lo largo de todo el siglo XIX, o la mal llamada «gripe española», que los soldados norteamericanos expandieron por Europa durante la primera guerra mundial.

No es de extrañar, por tanto, que científicos y profesionales de numerosas disciplinas (fisiólogos, médicos clínicos, bioquímicos, farmacéuticos, virólogos, etc.) hayan dedicado notables esfuerzos al desarrollo de técnicas industriales o herramientas bioquímicas para el control y mitigación del riesgo de pandemias, tales como la potabilización y depuración del agua, la pasteurización y esterilización de alimentos, los antibióticos sintéticos, las vacunas y antivirales, o más recientemente las pruebas rápidas de antígenos. Entre dichas disciplinas se incluyen también las matemáticas y la estadística, objeto de este capítulo, que resultan fundamentales para caracterizar cómo, cuándo y cuánto se propaga una pandemia, cómo afectarán las diferentes medidas sanitarias y de distanciamiento social al número de contagiados, ingresados y fallecidos, qué impacto tendrá la pandemia en el uso de las infraestructuras sanitarias y en la economía, etc.

Una de las primeras aportaciones matemáticas conocidas al análisis del impacto sobre la población de un virus, en este caso la viruela, fue realizada por Daniel Bernoulli (de León 2020). Este médico y matemático de la conocida saga familiar desarrolló un modelo

probabilístico, basado en hipótesis bastante simples, que permitía estimar la esperanza de vida con y sin vacunación (que entonces se denominaba «variolización»).

Desde entonces, matemáticos, ingenieros y economistas han desarrollado numerosas herramientas y modelos, que abarcan desde la estadística (rebautizada en los últimos años como «analítica de datos»), hasta la dinámica de sistemas, para la interpretación, tratamiento y filtrado de series temporales de datos, con el objetivo de extraer información útil de dichas observaciones, inciertas por definición, y así poder caracterizar patrones, tendencias, valores promedio, valores extremos, etc. Estas herramientas y modelos son de aplicación transversal, y se pueden utilizar indistintamente en problemas de ingeniería, ciencias de la vida o de la tierra, econometría o incluso sociología.

Para el caso concreto de una epidemia vírica, tal como la del COVID-19, existen básicamente tres grandes categorías de métodos para caracterizar su evolución a partir de datos epidemiológicos, a saber:

1. **Métodos fundamentalmente estadísticos**, que intentan determinar la evolución de una pandemia desde una filosofía «caja negra», es decir, sin entrar a analizar las causas que explican las interacciones entre las magnitudes involucradas. A partir de una serie temporal de datos observados en el pasado, por su propia naturaleza mucho más inciertos que los manejadas por los físicos (p. ej. aceleradores de partículas) o los ingenieros (p. ej. la trayectoria de un avión), se trata de caracterizar o predecir, con el menor error posible, la evolución futura de las variables observadas, u otras variables de interés derivadas de ellas.
2. **Métodos esencialmente deterministas**, basados en dinámica de sistemas, que intentan caracterizar mediante un modelo matemático la realidad «física» que subyace bajo los datos observados. En el caso de una pandemia vírica, estos modelos consideran, por ejemplo, cómo de contagioso es el virus, en qué medida afecta que los individuos susceptibles estén en casa, en el trabajo o en el ocio, cuánto tarda un infectado en promedio en infectar a sus contactos, cómo afecta la edad a las tasas de mortalidad, etc. (Pueyo 2020; Imperial College 2020). Este tipo de modelos son ampliamente usados en ingeniería, porque la dinámica del sistema analizado está generalmente bien caracterizada, mediante relaciones matemáticas que surgen de leyes universalmente aceptadas (Newton, Maxwell, etc.).
3. **Métodos híbridos**, que de algún modo combinan técnicas de las categorías anteriores, intentando sortear sus limitaciones. En efecto, las ecuaciones que modelan la dinámica de una pandemia, entre individuos de una población susceptible, se basan en parámetros o constantes que no se conocen con suficiente precisión, o lo que es peor, van cambiando a lo largo del tiempo (p. ej. las tasas de contagio o de mortalidad de un virus). Si no se tiene en cuenta la incertidumbre o variabilidad de dichos parámetros, el modelo acabará por suministrar resultados inaceptables, salvo que periódicamente se realice algún tipo de ajuste de parámetros. Una solución consiste en hibridar un modelo dinámico con una herramienta estadística de estimación (p. ej. un ajuste de mínimos cuadrados), de forma que, mediante un filtrado de los datos observados, se determina la evolución temporal de las variables que caracterizan la pandemia, a la vez que se sintonizan o actualizan los parámetros más volátiles. El filtro de Kalman descrito posteriormente encajaría en esta categoría de métodos híbridos.

En el resto del capítulo se revisarán sucintamente las principales herramientas o técnicas que se han propuesto y utilizado para modelar y caracterizar matemáticamente la evolución de una pandemia vírica, ilustrándolas cuando se considere necesario con ejemplos tutoriales. En la segunda parte se mostrarán los resultados más notables de aplicar dichas técnicas al caso de la COVID-19, especialmente en las sucesivas olas ocurridas en España.

1. CONCEPTOS PRELIMINARES: CURVAS Y PENDIENTES

Antes de introducir las diferentes herramientas matemáticas utilizadas habitualmente para caracterizar la dinámica de una pandemia vírica, en esta sección se presentarán algunas nociones básicas e indicadores, que el lector no especialista habrá conocido a través de los medios. Así mismo, se introducirán una serie de patrones de comportamiento teóricos o idealizados, que permiten explicar cualitativamente la evolución de una pandemia como una sucesión de curvas en forma de campana, cada una correspondiente a una ola.

En este texto, la serie temporal de cualquier variable pandémica x se representa como $x(n)$, donde n se refiere al instante de tiempo discreto (en nuestro caso el día en el que se reporta el dato en cuestión). La variable x puede referirse al número de pruebas positivas (PCRs o test de antígenos), número real de infectados (que siempre es un valor estimado, típicamente bastante superior al número de positivos reportados), número de hospitalizados, número de enfermos en UCI, fallecidos, recuperados o vacunados. A su vez, cada variable puede representar un valor diario (p. ej. fallecimientos reportados en el día n), un valor en un período de tiempo determinado (7 o 14 días), o un valor acumulativo, definido como la

suma de todos los valores de la serie temporal reportados hasta el día, es decir:

$$X_s(n) = \sum_{k=1}^{k=n} x(k)$$

Por definición, un indicador acumulativo nunca decrece. De hecho, se ha observado experimentalmente que cualquier indicador pandémico acumulativo sigue una curva aproximadamente sigmoidea cuando se refiere a una población susceptible grande pero finita. Esto es, una curva en forma de «S», que crece exponencialmente al principio, cuando la sociedad está desprevenida y aún no se han adoptado medidas de distanciamiento social, continúa posteriormente con una fase de crecimiento lineal sostenido, cuando se toman precauciones para disminuir los contagios, y termina saturándose cuando estos desaparecen por completo. La figura 1A ilustra un caso hipotético en el que 3 millones de personas acaban infectándose, de los cuales solo un tercio, aproximadamente, han sido reportados como positivos. En el caso concreto de la COVID-19, la gran mayoría de positivos se acaba recuperando, mientras que una pequeña fracción fallece, tal como ilustra la figura (la curva de fallecidos también sigue una evolución en «S», que sin embargo la escala vertical adoptada no permite apreciar). Pero en otras epidemias víricas estas proporciones pueden ser muy diferentes.

Restando los valores de las curvas acumulativas correspondientes a dos días consecutivos, se obtienen obviamente los casos diarios, que son generalmente los datos reportados por las autoridades sanitarias. Matemáticamente, los casos diarios se obtienen diferenciando los casos acumulativos (o derivando, si el tiempo fuese una variable continua),

$$x(n) = X_s(n) - X_s(n-1)$$

y viceversa, los casos acumulados se obtienen sumando (integrando) los casos diarios,

$$X_s(n) = X_s(n-1) + x(n)$$

Las curvas de casos diarios tienen siempre forma de campana, no necesariamente simétrica, como se ilustra en la figura 2A.

Amén de los casos diarios, para los epidemiólogos resulta también de gran interés el cómputo de los infectados activos, $I_a(n)$, que son aquellos infectados que aún no se han recuperado ni fallecido. Sin embargo, como ocurre con los infectados diarios, este indicador no se conoce con exactitud, y solo se puede estimar indirectamente, en base a modelos, muestreos poblacionales u otros indicadores reportados. Por ello, se utiliza como *proxi* el número de positivos activos, $P_a(n)$, el cual se obtiene por diferencia entre los positivos y la suma de

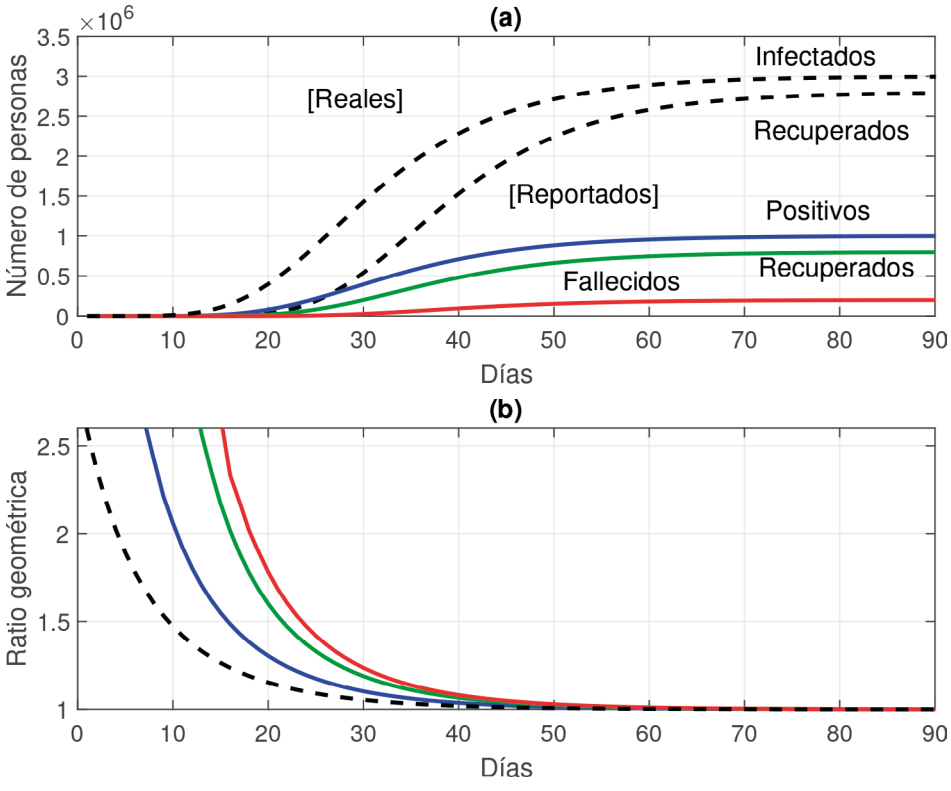


Figura 1. Ilustración de curvas acumulativas de diversos indicadores (a) y razones geométricas de las series temporales respectivas (b)

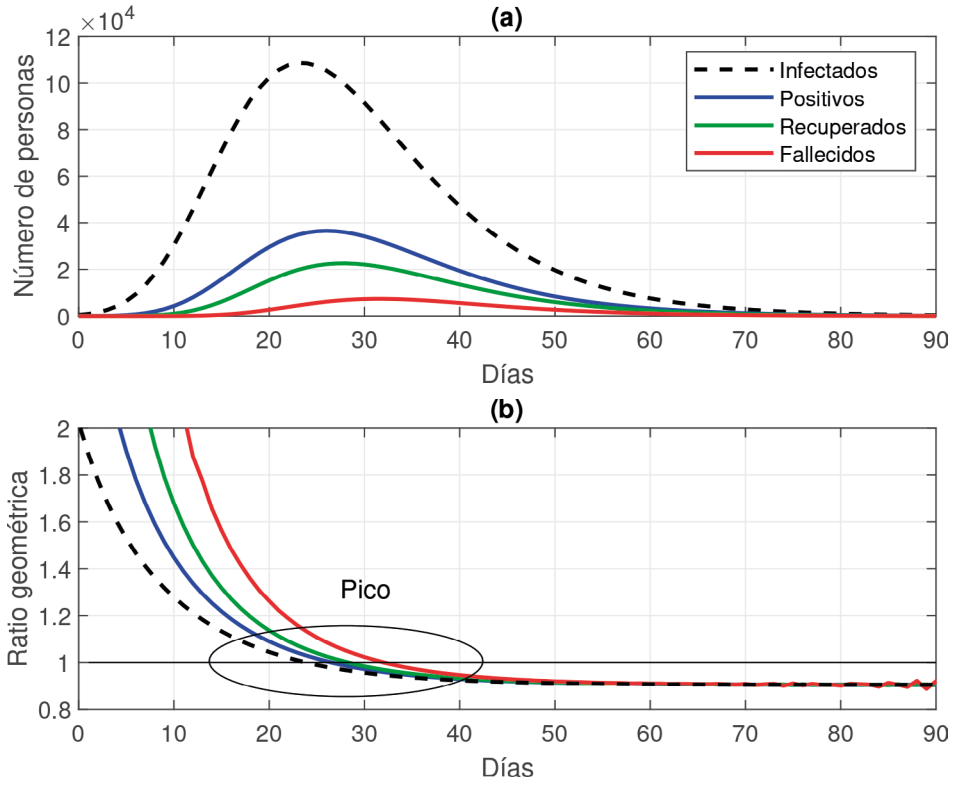


Figura 2. Ilustración de curvas de casos diarios para diversos indicadores (a) y razones geométricas de las series temporales respectivas (b)

recuperados (R) y fallecidos (representados con la letra D, de decesos), todos ellos acumulativos, es decir,

$$P_a(n) = P_s(n) - [R_s(n) + D_s(n)]$$

La figura 3A muestra la curva de positivos activos correspondiente al ejemplo hipotético de las figuras 1 y 2, que como se puede apreciar también tiene forma de campana.

El pico de esta curva marca el día en que el número de recuperados diarios excede al de positivos diarios, que aproximadamente coincide con el día en que el número de recuperados excede al de infectados. Este es también el punto de inflexión de la curva sigmoidea, cuando el crecimiento de la curva acumulativa se ralentiza, al disminuir el número de individuos susceptibles que entran en contacto con infectados.

En un trabajo publicado recientemente por los autores (Gómez-Expósito 2021), se propone el uso sistemático de la razón geométrica de las series de datos reportados para caracterizar sintéticamente la evolución de una pandemia, como complemento o alternativa al número reproductivo del virus (con el que está directamente relacionado, como se explicará en la siguiente sección). La razón geométrica de una serie temporal es el cociente entre dos valores consecutivos

$$r(n) = x(n+1) / x(n)$$

y permite reconstruir la serie completa a partir del valor de la magnitud en un instante dado,

$$x(n) = x(n_0) \prod_{k=n_0}^{k=n-1} r(k)$$

La razón geométrica es una forma alternativa de medir la velocidad de crecimiento de una magnitud, o lo que es lo mismo, la pendiente de la curva. En efecto, puesto que la velocidad se obtiene diferenciando (derivando) en el tiempo:

$$V(n) = [x(n+1) - x(n)] / T$$

al ser $T = 1$ día en nuestro caso, se deduce inmediatamente la relación entre velocidad de crecimiento y razón geométrica,

$$V(n) = [r(n) - 1]x(n)$$

Por lo tanto, cuando $r(n) > 1$ el virus está progresando (pendiente positiva) mientras que $r(n) < 1$ indica que la propagación del virus está menguando (pendiente negativa). Es fácil ver que, para magnitudes acumulativas, como en la figura 1B, el valor de $r(n)$ tiende asintóticamente a 1 conforme se acerca el régimen permanente, pero nunca baja de 1 puesto que una magnitud

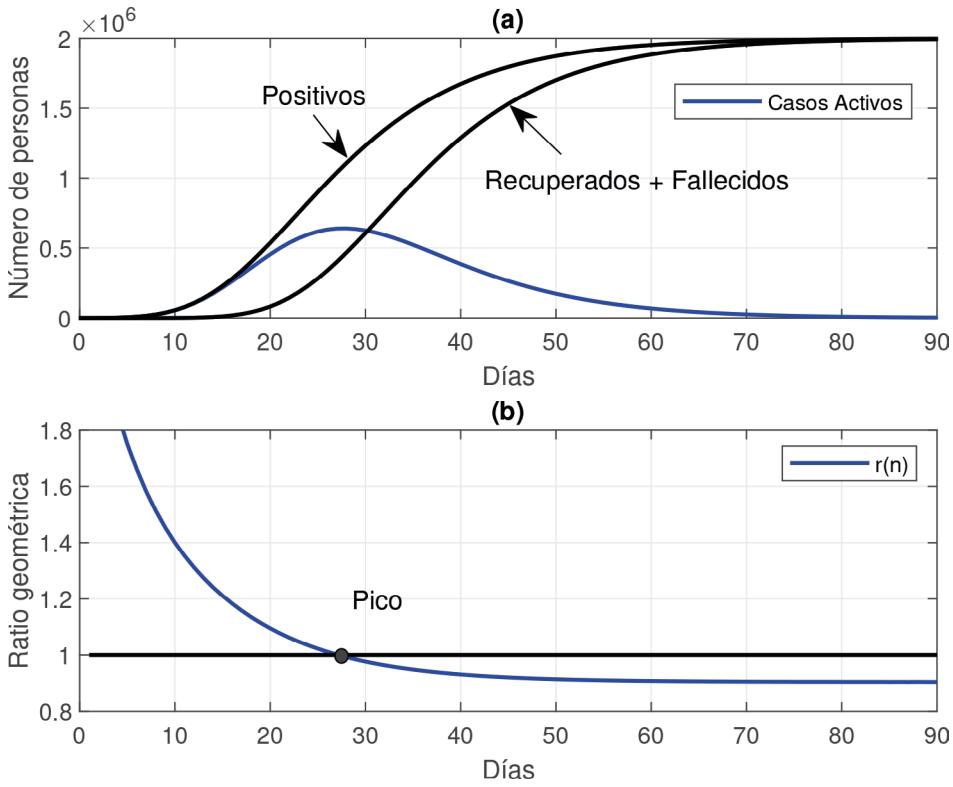


Figura 3. Ilustración de la curva de positivos reportados (a) y razón geométrica resultante (b)

acumulativa no puede decrecer, por definición. En cambio, en las curvas en forma de campana (valores diarios o activos), tal como en las figuras 2.b y 3.b, el valor $r(n) = 1$ marca el pico de la curva, cuya determinación exacta es de gran interés para las autoridades sanitarias, puesto que permite planificar con antelación la toma de decisiones y el uso óptimo de las infraestructuras. Cuanto mayor sea la diferencia $r(n) - 1$, más rápidamente crecerá (si es positiva) o decrecerá (si es negativa) la propagación del virus. Por ejemplo, para una variable que se actualiza diariamente, un valor $r(n) = 1{,}35$, valor observado en España para la serie temporal de positivos diarios al comienzo de la primera ola implica un crecimiento diario del 35 %, lo que significa que el número de casos se duplica aproximadamente cada dos días. En cambio, un valor de 0,9 (valor que a duras penas se alcanzó al final de la primera ola) implica una reducción del 90 % de casos en tres semanas.

Como puede apreciarse en las figuras anteriores, la evolución de $r(n)$ es, al menos teóricamente, una curva exponencial decreciente (similar a la de los sistemas dinámicos de primer orden), suponiendo que las condiciones de contorno no se modifican a lo largo del tiempo. Esta observación otorga un valor adicional al uso de la razón geométrica para estimar el pico de una ola, frente a otros indicadores tradicionalmente usados por los epidemiólogos, tal como el número reproductivo. En efecto, a partir de una ventana de datos correspondientes a una variable $x(n)$, reportados durante la fase de crecimiento exponencial, se obtiene directamente la serie temporal de $r(n)$. En base a dicha serie, se puede determinar, mediante un ajuste paramétrico de mínimos cuadrados, la evolución exponencial decreciente que mejor encaja con las observaciones, viniendo determinado el pico de la curva de campana por el día n_p en que $r(n_p) = 1$. Todo ello sin tener que conocer o estimar el número reproductivo del virus en cuestión, que dista mucho de ser una cuestión baladí (Blakeley 2011).

Idealmente, toda epidemia debería presentar únicamente una ola, si realmente dejase de haber individuos susceptibles al final de dicha ola. Sin embargo, por razones socioeconómicas, las estrictas medidas de distanciamiento social que se adoptan en estos casos no se pueden mantener indefinidamente, y se suelen relajar antes de que el número de infectados se reduzca lo suficiente, lo cual conduce a un aumento paulatino del número de contagios y a sucesivas olas. Las consideraciones anteriores permiten analizar cualitativamente la evolución de una pandemia como una sucesión de curvas en forma de campana, cada una correspondiente a una ola. Lamentablemente, los períodos latentes entre olas no son tan fáciles de caracterizar matemáticamente, puesto que los datos reportados son aún más inciertos y no siempre siguen un patrón bien definido.

2. MODELOS ESTADÍSTICOS: FILTRADO Y AJUSTE A CURVAS CARACTERÍSTICAS

Como se indicó anteriormente, en esta categoría se incluyen los métodos que no modelan o analizan en detalle las diferentes dinámicas que intervienen en la propagación de una epidemia, desde los procesos puramente bioquímicos (duración de la infección, morbilidad del virus, etc.) hasta los aspectos sociológicos (distancia social, movilidad, recursos sanitarios, etc.), sino que intentan explicarlas en base a un análisis meramente numérico de las magnitudes observadas. Dentro de esta categoría se pueden distinguir dos subgrupos:

a) Modelos matemáticos estadísticos, que no realizan ninguna suposición previa sobre la forma en que se espera que evolucionen las magnitudes involucradas. Aquí se incluyen las herramientas clásicas de la econometría, tales como medias móviles (imprescindibles si se quiere filtrar la gran volatilidad de los datos epidémicos que reportan las autoridades sanitarias), estudios de correlación entre magnitudes, que permiten indagar sobre relaciones causa-efecto (p. ej. entre positivos y hospitalizados o fallecidos), o desfases temporales (p. ej. retrasos entre el pico de infectados y el de fallecidos). Más recientemente, se han propuesto incluso técnicas de aprendizaje automático pertenecientes a lo que se ha dado en llamar «*machine learning*» (Alimadadi 2020).
b) Modelos matemáticos basados en la hipótesis de que la evolución de la pandemia (número de personas infectadas, decesos, etc.) sigue una curva o función matemática predeterminada (de acuerdo con patrones históricos), cuyos coeficientes pueden ser estimados en base a la serie temporal de datos reportados (p. ej. mediante un ajuste por mínimos cuadrados). Por ejemplo, en (BIOCOMSC 2020) se asume que la evolución del número total (o acumulativo) de personas infectadas puede ser aproximada satisfactoriamente por una curva sigmoidea, mientras que en Madden (1980) se propone como curva tipo la conocida como curva de Gompertz, que puede tener dos o tres grados de libertad. En Gómez-Expósito (2021) se ajusta la razón geométrica de la serie de contagios diarios a una exponencial decreciente, lo cual permite predecir con bastante precisión el pico de una ola, como se explicó anteriormente.

A continuación, se ilustrarán algunas de las técnicas que se acaban de describir, con datos reales o simulados. Sin duda la técnica más simple es la de aplicar una ventana móvil a una serie temporal de datos, con objeto de filtrar las fluctuaciones rápidas (errores) asociadas a dichos datos. Dada una serie temporal $x(n)$, la media móvil X_N para una ventana con los últimos datos reportados se obtiene simplemente de la siguiente expresión:

$$X_N(n) = \frac{1}{N} \sum_{k=n=N+1}^{k=n} x(k)$$

Por ejemplo, la figura 4 muestra los datos reportados (sin filtrar) del número de fallecidos (a) y hospitalizados (b) diariamente en Andalucía por COVID-19 desde el 1 de diciembre de 2021 hasta el 20 de enero de 2022, en plena sexta ola, así como las respectivas medias móviles con una ventana de 7 días.

Puede observarse que el valor medio no ha dejado de crecer desde el puente de diciembre, sobre todo tras las vacaciones navideñas, mientras que los valores diarios sufren fuertes oscilaciones. Como es bien sabido, la media introduce un retraso, tanto mayor cuanto más ancha es la ventana considerada, lo cual no deja de ser un inconveniente de este tipo de filtros, particularmente cuando las cifras están subiendo, puesto que pueden dar una señal de alarma demasiado tarde para tomar medidas si la ventana es muy ancha, o el resultado puede ser muy incierto si la ventana es demasiado estrecha.

Se aprecia visualmente que existe una correlación entre el número de hospitalizados y el de fallecidos, con un cierto retraso entre ambas series de datos. La correlación se pone más claramente de manifiesto en la figura 5, donde se representan las parejas de valores de las medias móviles de la figura 4 correspondientes al mismo día, es decir, ignorando inicialmente el posible retraso (causa-efecto) entre fallecidos e ingresados. En la figura se representa así mismo la recta de regresión lineal, que conduce a un coeficiente de correlación $R^2 = 0.745$. Este reducido valor de R^2 indica que la calidad del ajuste lineal no es buena, debido precisamente a que se ha ignorado el mencionado retraso, contrastado empíricamente, entre hospitalizados y fallecidos (análogamente existe un desfase temporal entre positivos reportados y hospitalizados). El retraso medio que mejor explica la causalidad entre ambas variables se puede obtener repitiendo la regresión lineal entre hospitalizados el día n y fallecidos el día $n + \delta$, para diferentes valores de δ, y retener el valor de δ que maximiza el coeficiente R^2. En el caso concreto de Andalucía, para la franja de días considerada, que abarca el final de la sexta ola, la mejor correlación se obtiene cuando el retraso δ es de 13 días (como se muestra en la figura 6, con un coeficiente $R^2 = 0.967$), lo cual explica que cuando se ha alcanzado el pico de hospitalizados, todavía siga creciendo el número de fallecidos.

La ventana móvil se ha venido utilizando sistemáticamente en numerosos países, sobre todo a partir de la segunda ola, para reportar diversos indicadores del avance

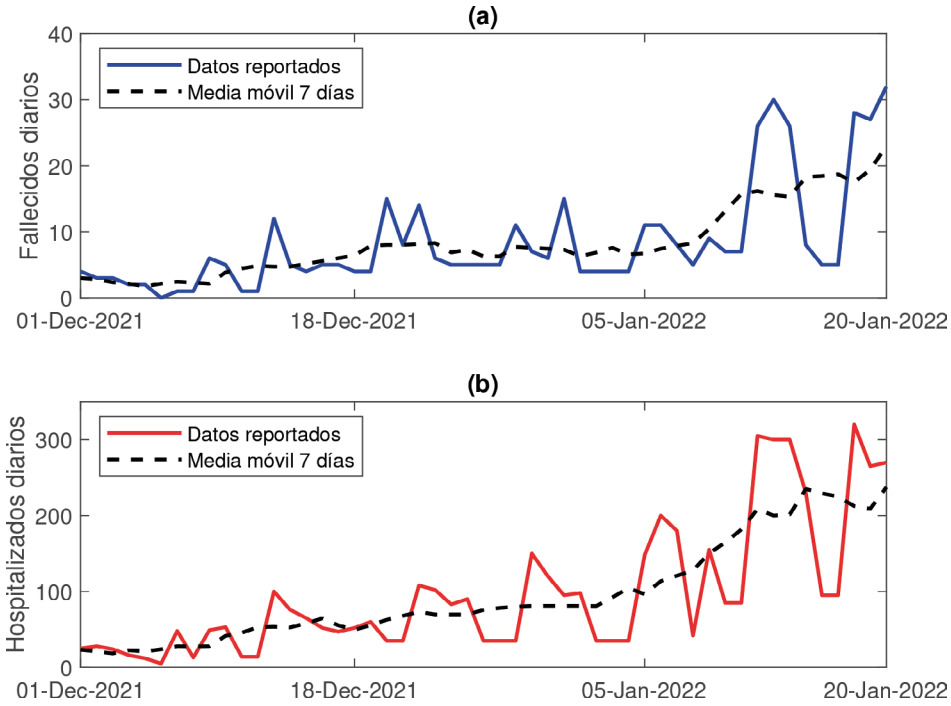


Figura 4. Fallecidos (a) y hospitalizados (b) en Andalucía desde el 1/12/2021 al 20/1/2022 [fuente: Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía]

de la epidemia, entre los que destaca la «tasa de incidencia acumulada» (que en este caso no es la media sino la suma de positivos reportados por cada 100.000 habitantes en los últimos 7 o 14 días), que tiene la ventaja, frente al número absoluto de positivos, de permitir comparar territorios independientemente del número de habitantes. La figura 7 muestra la tasa de incidencia acumulada para diferentes comunidades autónomas, desde principios de noviembre de 2021 hasta el 20 de enero de 2022, cuando prácticamente se había superado el pico de positivos de la sexta ola, pero no así el de fallecidos.

Otro indicador muy común es la llamada «tasa de positividad», o porcentaje de personas que dan positivo de entre todas a las que se les ha hecho prueba PCR durante un tiempo determinado (p. ej. una semana). La OMS recomienda que dicha tasa no supere el 5 %, umbral que se ha superado ampliamente en España en varias ocasiones. La figura 8 muestra la evolución de la tasa de positividad en varios países europeos desde junio de 2021 hasta enero de 2022.

Por lo que respecta a los métodos que presumen una determinada forma para la evolución de las principales

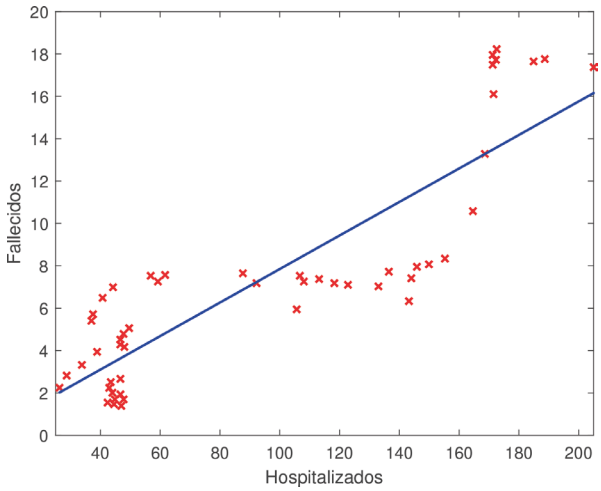


Figura 5. Fallecidos frente a hospitalizados el mismo día en Andalucía desde el 1/12/2021 al 20/1/2022, y recta de regresión lineal resultante

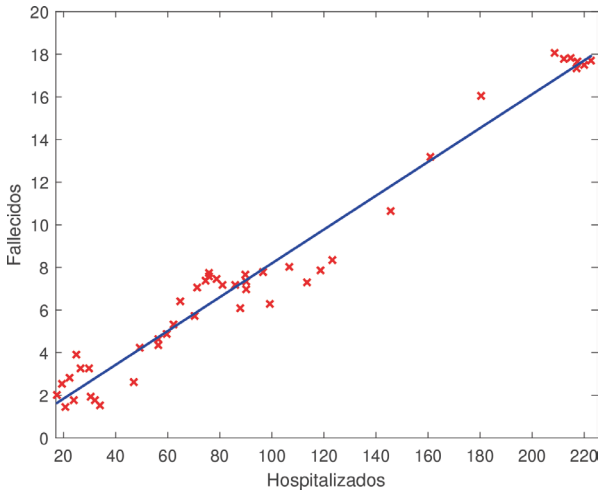


Figura 6. Fallecidos frente a hospitalizados 13 días antes en Andalucía desde el 1/12/2021 al 20/1/2022, y recta de regresión lineal resultante

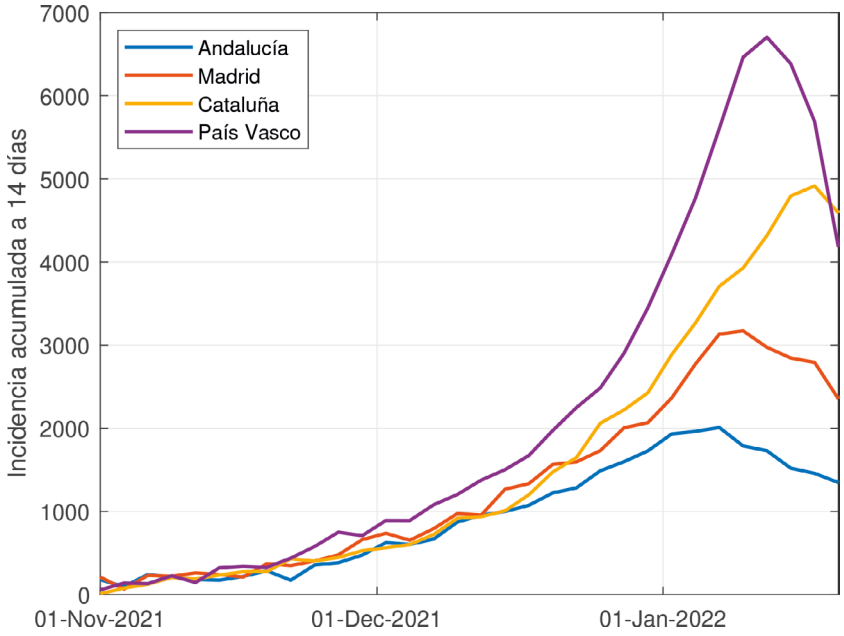


Figura 7. Tasa de incidencia acumulada en diversas comunidades autónomas desde el 1/11/2021 al 20/1/2022 [fuente: https://cnecovid.isciii.es]

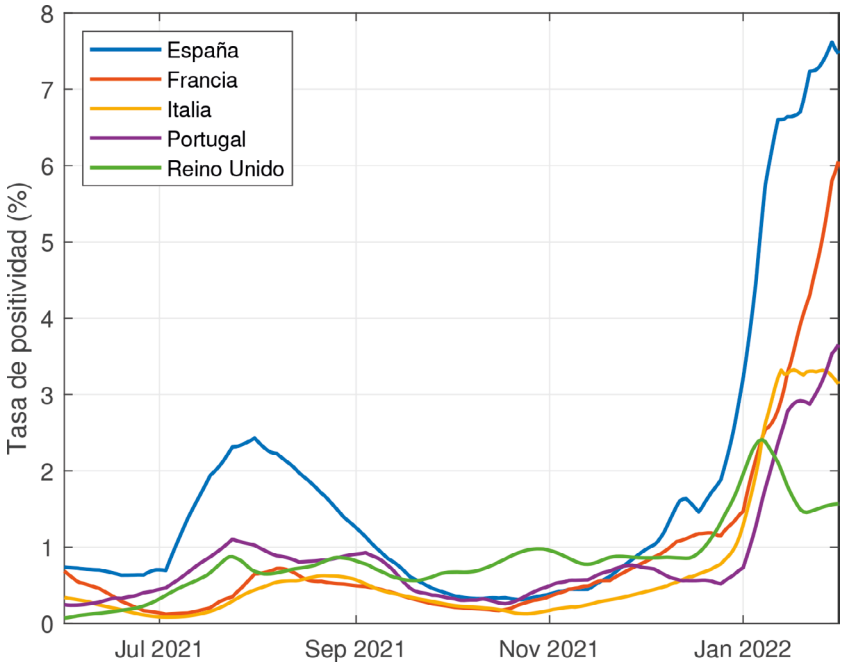


Figura 8. Tasa de positividad en diversos países europeos entre junio de 2021 y enero de 2022 [fuente: Our World in Data]

magnitudes de la pandemia, uno de los patrones de curva sigmoidea más utilizado para magnitudes acumulativas (BIOCOMSC 2020) es el propuesto por Gompertz, que responde a la expresión:

$$X_S(n) = Ke^{-\ln[K / X_S(n_0)]\, e^{-\alpha(n-n_0)}}$$

la cual permite obtener el número de casos totales o acumulados hasta el día n a partir de los casos existentes en un determinado día n_0. Los dos parámetros K y α, que definen completamente la curva, se pueden obtener mediante un ajuste de mínimos cuadrados a partir de una serie temporal de datos acumulativos. Por ejemplo, la figura 9 representa los positivos reportados en España durante los primeros 100 días de pandemia, junto a la curva de Gompertz que mejor se ajusta a los datos observados.

Posteriormente, en la sección de resultados, se mostrará para diversos países en qué medida la razón geométrica, $r(n)$, se ajusta al patrón de una exponencial decreciente, al menos durante las fases de rebrotes.

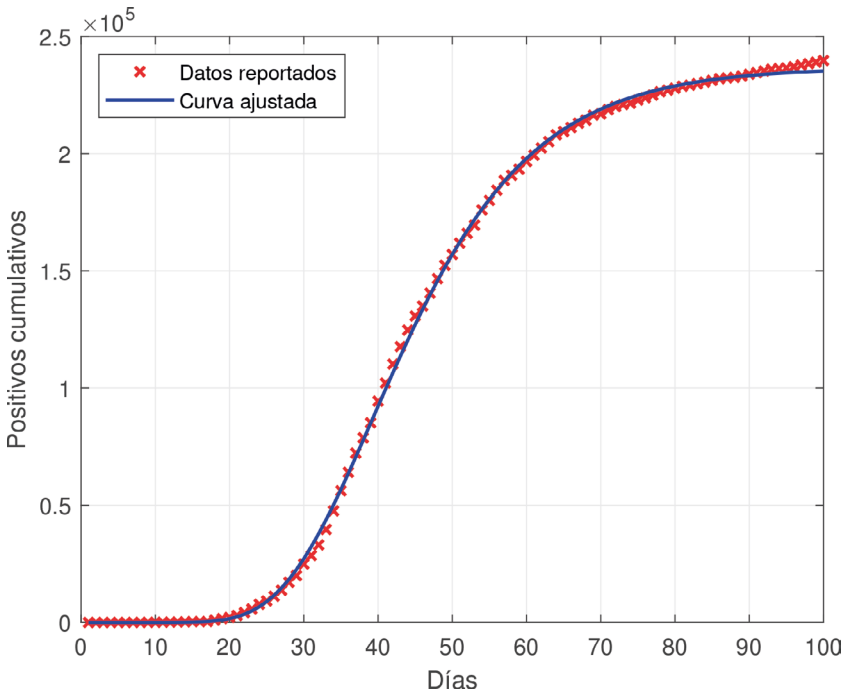


Figura 9. Evolución del número de positivos reportados en España durante los primeros 100 días de pandemia, y ajuste por mínimos cuadrados a una curva de Gompertz

3. MODELOS FÍSICOS: SIR Y SUS VARIANTES

En el ámbito epidemiológico, entre los métodos más populares están los que derivan del modelo SIR (Susceptibles-Infectados-Recuperados) (Giordano 2020), como el usado, por ejemplo, en (BIOCOMSC 2020) para analizar la evolución del COVID-19 en Italia. Dicho modelo se usa también en Madden (1980), donde se predice la evolución de la pandemia mediante un novedoso algoritmo de filtrado.

El modelo SIR puede representarse matemáticamente mediante ecuaciones diferenciales de funciones continuas del tiempo,

$$\dot{S}_s(t) = -\beta \cdot S_s(t) I_a(t) / N$$

$$\dot{I}_a(t) = \beta \cdot S_s(t) I_a(t) / N - \gamma \cdot I_a(t)$$

$$\dot{R}_s(t) = \gamma \cdot I_a(t)$$

donde $S_s(t)$ y $R_s(t)$ son, respectivamente, los valores acumulados o totales de personas susceptibles y recuperadas de la infección, $I_a(t)$ representa al número de personas con infección activa (no confundir con el total acumulado de personas que han pasado la enfermedad), β y γ son las ratios de transmisión y de recuperación, respectivamente, y N es la población total de la región bajo estudio. Entre estas magnitudes debe satisfacerse $N = S_s(t) + I_a(t) + R_s(t)$, es decir, los que ya se han recuperado de la enfermedad mantienen suficiente grado de inmunidad como para no contagiarse de nuevo. Nótese que, en este modelo tan compacto, las defunciones, paradójicamente, se incluyen entre los recuperados $R_s(t)$ (otra opción sería sustraerlos de la población total N).

Para fines prácticos es conveniente usar una formulación en el dominio del tiempo discreto, como la obtenida por integración numérica a partir de la formulación continua. Si enriquecemos dicha formulación mediante la inclusión explícita de las defunciones, tendremos un modelo SIR extendido (ESIR):

$$S_S(n+1) = S_S(n) - \beta \cdot S_S(n) I_a(n) / N \quad (1)$$

$$I_a(n+1) = I_a(n) + \beta \cdot S_s(n) I_a(n) / N - (\gamma + \mu) I_a(n) \quad (2)$$

$$R_S(n+1) = R_S(n) - \gamma \cdot I_a(n) \quad (3)$$

$$D_S(n+1) = D_S(n) + \mu \cdot I_a(n) \quad (4)$$

donde n es el tiempo (en días) desde un origen establecido, n_0, $D_s(n)$ es la cantidad acumulada de defunciones y μ es la ratio de mortalidad. Por simplicidad de notación, se seguirá usando el símbolo $R_s(n)$ en (3), aunque ya no incluya a las defunciones.

Los datos reportados públicamente, disponibles en referencias como (Worldometers 2022; Github 2021), típicamente comprenden las siguientes tres variables:

— Cantidad acumulada de personas que han dado resultado positivo en un test oficial. Esta variable, por tanto, no incluye a las personas que aun estando infectadas no se han sometido a test, como puede ocurrir con gran cantidad de infectados

asintomáticos. Esta cantidad acumulada de positivos se designará por $P_s(n)$.

— Cantidad acumulada de personas recuperadas de la infección que previamente han dado positivo en un test, $R_s(n)$.

— Cantidad acumulada de defunciones, $D_s(n)$, que se asume como la utilizada en el modelo ESIR, aunque el número real de defunciones pueda diferir de las cantidades reportadas como defunciones atribuidas a la COVID-19.

Algunas fuentes proporcionan directamente el número de positivos activos, $P_a(n)$, ya definido anteriormente como $P_a(n) = P_s(n) - R_s(n) - D_s(n)$. Nótese que tanto $I_a(n)$ como $P_a(n)$ deben tender a cero conforme avanza el tiempo hacia el final del brote, mientras que el resto de las magnitudes acumulativas tenderán asintóticamente hacia un valor máximo de régimen permanente (véase la sección sobre conceptos preliminares).

En epidemiología, también se usa con frecuencia el así llamado número de reproducción básico, R_0 (número medio de personas infectadas por una persona infecciosa en los inicios del brote infeccioso), para caracterizar como de rápido se propaga una epidemia en su comienzo. Un valor $R_0 > 1$ indica que la epidemia progresará de modo exponencial. Conforme pasa el tiempo, el número de personas susceptibles decrece, ya sea por el incremento de personas recuperadas que crean inmunidad, por los fallecimientos, o como consecuencia de las medidas de distanciamiento social, y R_0 se sustituye por el número de reproducción efectivo, R_t. En términos de los coeficientes del modelo ESIR, R_0 y R_t vienen dados por:

$$R_0 = \beta / (\gamma + \mu) \quad ; \quad R_t(n) = R_0 S_s(n) / N$$

Sin embargo, como se discute minuciosamente en (Blakeley 2011), el número reproductivo R_0 no está libre de ambigüedad o controversia en cuanto a su capacidad para estimar la severidad de un brote. Es más, si R_0 se estima a partir de las series de datos de los datos reportados, como en (Rondón 2020), entonces, no hay modo de comprobar la precisión de las estimaciones, al menos para un nuevo virus como el COVID-19 en sus primeras olas y en las nuevas variantes. Esto explica los intervalos de confianza tan amplios que se han venido reportando para los valores de R_0 (Sanche 2020). Argumentos similares aplican a R_t.

Por esta razón, además de R_0, los autores han postulado el uso de un índice más intuitivo y medible, relacionado con la tasa de crecimiento de la población infectada para caracterizar su evolución. Si expresamos la evolución diaria de la población infectada activa como una sucesión geométrica:

$$I(n+1) = r(n) \cdot I(n) \qquad (5)$$

donde $r(n)$, es la razón geométrica de la sucesión, variable con el tiempo, entonces el crecimiento relativo diario de infectados se obtiene de:

$$\text{Ratio de crecimiento (p.u.)} = \Delta I(n) / I(n) = r(n) - 1$$

Como se indicó anteriormente, en la sección dedicada a conceptos previos, en tanto que $r(n) > 1$, el brote viral continuará su expansión, mientras que si $r(n) < 1$ el brote acabará extinguiéndose. Por tanto, no hay ambigüedad en el uso de $r(n)$ cuando nos referimos a la evolución de la totalidad de la población. Nótese, sin embargo, que si (5) se expresara en términos de magnitudes acumuladas, en lugar de casos diarios, tendríamos que dicha ratio $r_s(n)$ tendería asintóticamente a 1.

Por comparación directa de (5) y (2), se obtiene la siguiente relación:

$$r(n) = 1 + \beta \cdot S_s(n) / N - (\gamma + \mu)$$

o, en términos de R_t:

$$r(n) - 1 = (\gamma + \mu)\,[R_t(n) - 1]$$

De la expresión anterior se deduce que $r(n) = 1$ si y solo si $R_t(n) = 1$, lo cual indica que ambos coeficientes son equivalentes para monitorizar un brote pandémico, difiriendo solo en un factor de escala. En efecto, conocido el valor de $r(n)$ todavía sería necesario averiguar algunos parámetros del modelo ESIR (γ y μ) para obtener el número de reproducción efectivo, $R_t(n)$. Sin embargo, hemos observado que no es necesario preocuparse por el valor de R_0 o R_t, al menos en el corto plazo, porque $r(n)$ es suficiente para el seguimiento de la evolución de la pandemia a partir de datos diarios. Esta observación parece haber pasado desapercibida para los epidemiólogos, que siguen refiriéndose exclusivamente a R_0 y R_t como únicos indicadores del progreso de un brote epidémico, a pesar de las dificultades que entraña su cálculo o estimación.

4. MODELOS HÍBRIDOS: FILTRO DE KALMAN

El filtro de Kalman (FK), propuesto para sistemas dinámicos lineales en 1960, junto a sus posteriores generalizaciones, es considerado como una de las herramientas fundamentales que permitieron la llegada a la Luna, por su uso en el guiado de las misiones espaciales del programa Apolo (Grewal 2010). Este filtro, que constituye una generalización de las técnicas conocidas como de mínimos cuadrados, estima la evolución del estado del

sistema dinámico de modo insesgado y con mínima varianza, esto es, de modo estadísticamente óptimo de acuerdo con las incertidumbres asumidas y los datos observados. Entre sus generalizaciones se encuentran las que permiten tratar casos no lineales, incluyendo situaciones en las que incluso se estiman parámetros del propio modelo. En todas estas formulaciones es necesario disponer de un modelo dinámico en variables de estado del sistema bajo estudio.

La referencia (Blakeley 2011) aplica el FK a la estimación de la evolución del SIDA, pero más recientemente también han aparecido estudios relacionados con el COVID-19. En Rondón (2020), el FK se usa para la estimación del número reproductivo del virus. En Sanche (2020) se propone un modelo de predicción a corto plazo en el que las ecuaciones de actualización en el tiempo se utilizan para predicciones futuras de la propagación del virus. La referencia (Evensen 1994) usa modelos ARIMA en combinación con FK para el seguimiento de la pandemia en Pakistán.

En este enfoque, partimos del modelo SIR básico, considerando que la población susceptible es suficientemente grande y varía de modo suficientemente lento como para no tener que ser considerada explícitamente en el modelo, de modo que su variación queda embebida en la ratio geométrica de la población afectada. En cambio, este modelo distingue explícitamente entre las personas que han resultado positivas en un test y las que, aun estando infectadas, no conocen o no han reportado su estado.

El objetivo que afrontaremos a continuación es estimar la evolución de $r(n)$ a partir de los datos reportados diariamente. Nótese que, si se consigue estimar de algún modo el valor de $r(n)$, la ecuación (1) se volverá innecesaria y el único efecto de la población susceptible será tenido en cuenta a través de la ecuación (2), en la propia $r(n)$.

A fin de sacar partido de los datos reportados de positivos, fallecimientos y recuperados, partiendo de (3)-(4), se introducen las siguientes relaciones:

$$P_a(n) = t(n) \cdot I_a(n) \tag{6}$$

$$D(n) = \mu(n) \cdot I_a(n) \tag{7}$$

$$R(n) = t(n) \cdot \gamma(n) \cdot I_a(n) = \gamma_t(n) \cdot I_a(n) \tag{8}$$

donde $t(n)$ es una ratio de testeo, que modela la fracción de infectados que son sometidos a test, resultan positivos y reportan el resultado, $D(n) = D_s(n) - D_s(n-1)$ es el incremento diario en el número de fallecidos, y $R(n) = R_s(n) - R_s(n-1)$ es la variación diaria en el número de recuperados.

Considerando (7) en dos instantes consecutivos, teniendo en cuenta (5):

$$D(n+1) = \mu(n+1) \cdot r(n) \cdot I_a(n)$$

$$D(n) = \mu(n) \cdot I_a(n)$$

y dividiendo:

$$r_D(n) = r(n) \cdot K_\mu(n) \tag{9}$$

donde $r_D(n) = D(n+1) / D(n)$ es la ratio de la cantidad de fallecimientos en dos días consecutivos y $K_\mu(n) = \mu(n+1) / \mu(n)$ es el cociente de dos ratios de mortandad consecutivos.

Operando de modo análogo con los positivos:

$$r_P(n) = r(n) \cdot K_t(n) \tag{10}$$

donde $r_P(n) = P(n+1) / P(n)$ es la ratio de positivos diarios consecutivos y $K_t(n) = t(n+1) / t(n)$ es la ratio de coeficientes $t(n)$ consecutivos.

Y similarmente con los recuperados:

$$r_R(n) = r(n) \cdot K_\gamma(n) \tag{11}$$

A partir de este modelo simple, formado por las ecuaciones (9)-(11), se puede formular un sistema de ecuaciones de transición de estados, necesario para cualquier FK, que permite estimar $r(n)$ mediante formulaciones no lineales de este filtro, como las *Extended* (EKF), *Unscented* (UKF) o *Ensemble* (EnKF) (Simon 2006; Evensen 1994). Este tipo de filtros de Kalman se han mostrado capaces de estimar, aunque sin pruebas de optimalidad estadística, tanto la evolución dinámica de las variables de estado como de los parámetros del sistema.

En esta propuesta, el vector de estado está formado por las ganancias $K\mu(n)$, $K_t(n)$ y $K\gamma(n)$, junto a la razón geométrica de infectados $r(n)$,

$$x(n) = [K_\mu(n) \quad K_t(n) \quad K_\gamma(n) \quad r(n)]^t$$

ninguna de ellas medida de forma directa, pero a las que se les supondrá una evolución lenta, desconocida pero aleatoria (conocida en inglés como *random walk*),

$$x(n) = x(n-1) + w(n) \tag{12}$$

siendo $w(n)$ un ruido blanco que modela la correspondiente incertidumbre.

En un sistema físico la información se obtiene en cada instante a partir de medidas proporcionadas por sensores,

que en nuestro caso se corresponden con las ratios obtenidas a partir de los indicadores reportados (fallecimientos, positivos y recuperados):

$$z(n) = [r_D(n) \quad r_P(n) \quad r_R(n)]^t$$

Junto a dichas «medidas», la hipótesis de variación lenta de las ratios $\mu(n)$, $t(n)$ y $\gamma_t(n)$, nos permite añadir pseudomedidas de valor 1 para $K\mu(n)$, $K_t(n)$ y $K_\gamma(n)$. Conviene insistir en esta idea, para que no pase desapercibida al lector: a diferencia de las ratios $r_x(n)$, que se calculan directamente de los valores reportados, las tasas γ_t, μ y t, no se conocen con certeza, pero parece razonable suponer que apenas cambian de un día para otro, lo cual implica que las constantes $K_x(n)$ puedan aproximarse por la unidad.

De este modo, las ecuaciones de estado (12) se complementan con una relación no lineal entre «medidas» y variables de estado:

$$z(n) = h[x(n)] + v(n) \qquad (13)$$

donde $v(n)$ es el vector de ruidos gaussianos que modela el error de medida y

$$h(x) = [r \cdot K_\mu \quad r \cdot K_t \quad r \cdot K_\gamma \quad K_\mu \quad K_t \quad K_\gamma]^t$$

En los países o regiones en los que falte alguna de las medidas utilizadas, la formulación puede rehacerse fácilmente. Por ejemplo, en el caso de que no se publiquen los casos recuperados, tendríamos:

$$x = [K_\mu \quad K_t \quad r]^t, \; h(x) = [r \cdot K_\mu \quad r \cdot K_t \quad K_\mu \quad K_t]^t.$$

En esta formulación, la única no linealidad (productos $r \cdot K_x$) aparece en la ecuación de medida (13) y puede ser tratada exitosamente por el EKF, realizando en cada iteración temporal una predicción lineal y una corrección no lineal, y proporcionando una estimación del estado, $\hat{x}(n)$, siendo su última componente la estimación buscada de $r(n)$. Conviene insistir en que dichas estimaciones de la ratio geométrica incorporan, de un modo estadísticamente óptimo, la información con ruido que nos proporcionan de forma conjunta los valores de $r_D(n)$, $r_P(n)$ y $r_R(n)$, de un modo más fiable que considerando sus valores de forma aislada o individual.

Además del modelo básico descrito, se han incorporado dos mejoras:

1. Se obtiene mejor resultado si el *random walk* en $r(n)$ se sustituye por una predicción o extrapolación lineal en base a su historia reciente, lo que permite mantener el carácter lineal de la ecuación de transición de estados.
2. Uso de la información y resultados acumulados hasta el instante n para mejorar las estimaciones previas. Para ello se ha implementado el suavizador Rauch-Tung-Striebel (RTS) (Simon 2006), que aprovecha la linealidad de la ecuación de transición de estados (12).

En Gómez-Expósito (2021) pueden encontrarse todos los detalles de dicha implementación, incluyendo la sintonización de los parámetros del propio filtro.

Adicionalmente, los resultados de este filtro permiten la estimación o predicción de dos magnitudes de gran interés:

1. **Predicción de picos**. Cuando una ola está en su fase expansiva, observaremos $r(n) > 1$ y resultará de gran interés predecir qué día en el futuro, n_p, se alcanzará el pico, caracterizado por $r(n_p) = 1$. Para este propósito, la secuencia $r(n)$ puede ajustarse a una evolución predeterminada que permita predecir su comportamiento futuro a partir de su historia. De acuerdo con lo observado empíricamente, hemos ajustado la secuencia $r(n)$ a una exponencial decreciente, característica de sistemas de primer orden, o de dinámicas gobernadas por un factor dominante, como puede ser el establecimiento de nuevas medidas de distanciamiento social.
2. **Estimación del número de personas infectadas activas**, $I_a(n)$. Esta magnitud puede estimarse a partir del número de infectados en algún día de referencia, como se indicó en la sección de conceptos previos:

$$I_a(n) = I_a(n_0) \cdot \prod_{i=n_0}^{n-1} r(i)$$

Esto significa que, además de los propios errores de la secuencia $r(n)$ la incertidumbre de $I_a(n)$ hereda la del valor inicial $I_a(n_0)$. Por tanto, como pasa también con el modelo SIR y, de hecho, con cualquier otro modelo basado en ecuaciones diferenciales, la estimación precisa de $I_a(n)$ en base a esta expresión requiere afrontar el reto del conocimiento preciso del número de infectados en un cierto día. En nuestras estimaciones para la primera ola en España se ha usado una estimación del número de positivos, con $I_a(n_0) = P_a(n_0) / t(n_0)$ asumiendo un valor para $t(n_0)$ por ejemplo $t(n_0) = 0.2$, suponiendo que el primer día de la serie hay 5 infectados por positivo reportado.

5. LA PANDEMIA DE LA COVID-19

En esta sección se van a presentar los resultados obtenidos de aplicar las técnicas descritas con anterioridad a los datos de la COVID-19, utilizando como fuente la base de datos en (Worldometers 2022).

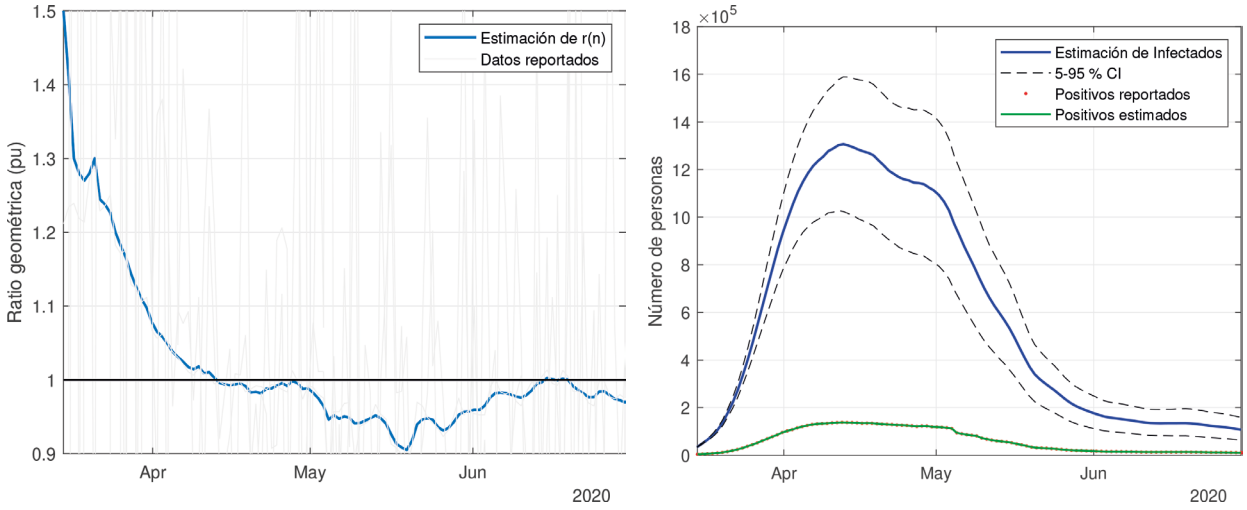


Figura 10. Estimación de ratio geométrica (izquierda) y del número de infectados activos (derecha) en España durante la primera ola

En primer lugar, se mostrarán los resultados correspondientes a la primera ola de la pandemia, comparando cómo evolucionó la ratio geométrica del número de infectados en diferentes países, lo cual permite analizar cómo afectan los distintos niveles de severidad en el confinamiento. A continuación, se presenta la evolución de la pandemia en la segunda y sucesivas olas, así como la influencia sobre la misma de aspectos tan importantes como la vacunación de la población.

5.1. La primera ola y el efecto del confinamiento

En el caso particular de España, el primer contagio de coronavirus se diagnosticó en febrero de 2020, mientras que el confinamiento domiciliario se estableció desde el 15 de marzo hasta el 21 de junio de ese mismo año. Utilizando los datos reportados de positivos, fallecidos y recuperados, y el método de estimación basado en filtros de Kalman que se ha presentado en la sección anterior, se muestra en la figura 10 (izquierda) la evolución de la ratio geométrica de los infectados activos $r(n)$, en este período de confinamiento (ojo, no confundir infectados con positivos). En esta gráfica se ha marcado con un punto el momento en el que esta variable tuvo su primer paso por 1, momento en el que se produce un cambio en la tendencia del número de infectados (conocido popularmente como el «pico» de infectados de la primera ola).

Es posible estimar la evolución del número real de infectados por el virus a partir de la serie temporal de la razón geométrica correspondiente. Para ello, es necesario conocer la ratio entre el número de positivos reportados y el número real de infectados en algún día concreto, $t(n_0)$. En este caso, dicho dato se obtuvo del resultado de un test masivo de seroprevalencia efectuado en España a mediados de mayo de 2020 (Newtral 2020), el cual determinó que el número total de infectados correspondía a un 5.2 % de la población (aproximadamente 2.3 millones de personas). Tomando como referencia este dato, se ajustó la curva de infectados tal y como se muestra en la figura 10 (derecha). Se ha incluido adicionalmente en esta gráfica el intervalo de confianza 5-95 %, así como el número de positivos reportados y estimados por el método propuesto. Como valor representativo, se puede observar que el máximo número de infectados activos en la primera ola fue aproximadamente de 1.3 millones.

En esta figura 10 puede apreciarse cómo inicialmente se produce un rápido descenso de la ratio geométrica de infectados, debido a las medidas restrictivas tomadas por las autoridades sanitarias. A continuación, se va a comparar de forma cualitativa este comportamiento para diferentes países: China, Italia, Corea del Sur, Estados Unidos y Reino Unido. En primer lugar, se muestra en la figura 11 la evolución de $r(n)$ en estos países hasta el día 5 de mayo de 2020, junto a la correspondiente estimación del número de infectados activos, asumiendo en todos los casos que $t(n_0) = 0.2$ (es decir, 5 infectados reales por cada positivo reportado). De esta gráfica pueden destacarse los siguientes aspectos:

- En los países asiáticos (China y Corea del Sur), donde la pandemia se inició con anterioridad, pueden verse diferentes comportamientos en la evolución de r(n). En el caso de Corea del Sur, una vez que se alcanza $r(n) < 1$, la tendencia de esta variable es mantener un valor aproximadamente constante, mientras que en China puede apreciarse un cierto rebote a mediados de marzo.
- Los resultados presentados para Italia son similares a los que ya se vieran para España, siendo en este caso el valor asintótico de $r(n)$ más próximo a 1.

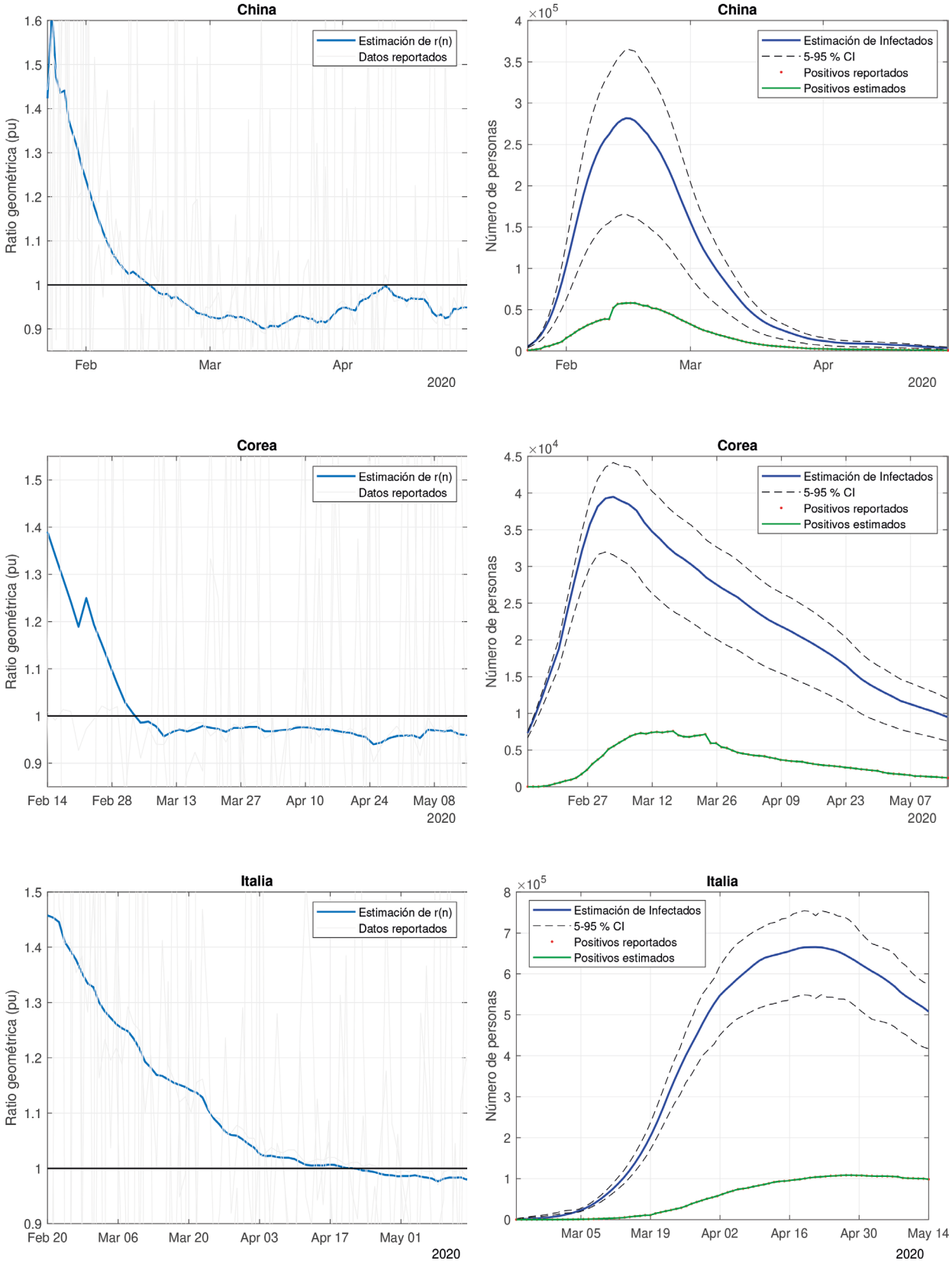


Figura 11. Estimación de ratio geométrica (izquierda) y del número de infectados activos (derecha) en diferentes países durante la primera ola

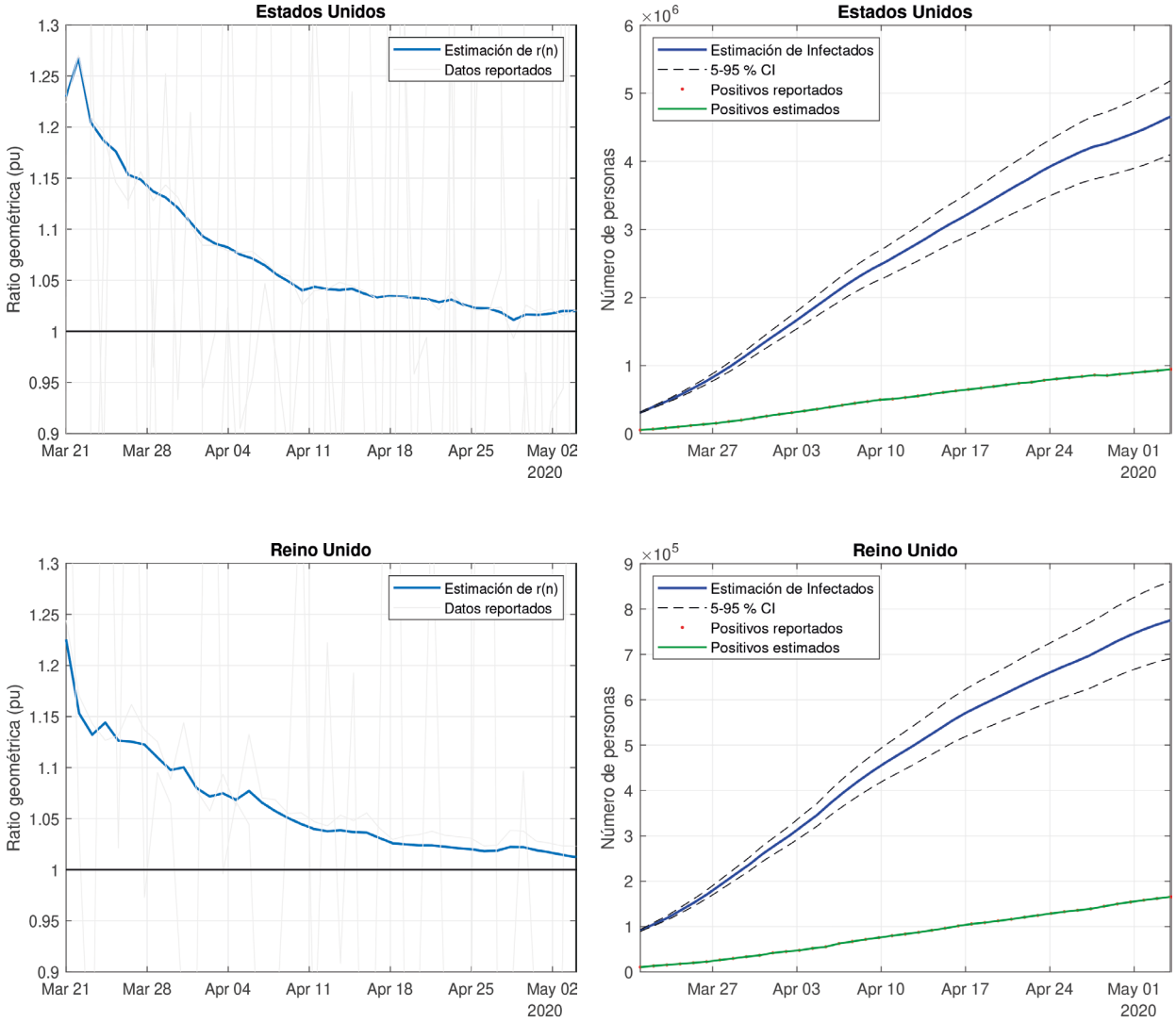


Figura 11. Estimación de ratio geométrica (izquierda) y del número de infectados activos (derecha) en diferentes países durante la primera ola *(cont.)*

— Finalmente, tanto en los Estados Unidos como en Reino Unido, no se había alcanzado el pico de la pandemia en la fecha final considerada. Sin embargo, en ambos casos puede verse cómo la tendencia de la ratio geométrica es asintótica hacia un valor superior a 1, lo cual indicaba en aquel momento que debían endurecerse las medidas a tomar.

En todos los casos mostrados en la figura 11 puede apreciarse, como se explicó en secciones anteriores, que el decaimiento de la ratio geométrica se asemeja a un comportamiento exponencial decreciente, típico de sistemas dinámicos de primer orden. Tomando ventaja de este hecho, se va a comparar la velocidad de descenso de $r(n)$ para los países que ya superaron en el período considerado el pico de contagiados, con una referencia de tiempo común para todos los países (el día en que se alcanzó el valor $r(n) = 1.2$. En la figura 12 se muestra esta comparación. Se puede comprobar que la reducción de la ratio geométrica fue más rápida en China, con solo 13 días de diferencia desde $(n) = 1.2$ hasta $r(n) = 1$ (pico), posiblemente como consecuencia de unas restricciones más severas. Por su parte, España y Corea del Sur presentan un comportamiento similar, siendo Italia el país con el descenso más lento, con aproximadamente 40 días hasta alcanzar el valor $r(n) = 1$.

5.2. Segunda ola y sucesivas

En España, el final del confinamiento domiciliario precedió al denominado período de «desescalada», en el que las diferentes comunidades autónomas, según sus niveles de incidencia acumulada, llevaban a cabo las medidas que se consideraban apropiadas, en términos de horarios en la hostelería, aforos, toque de queda, etc.

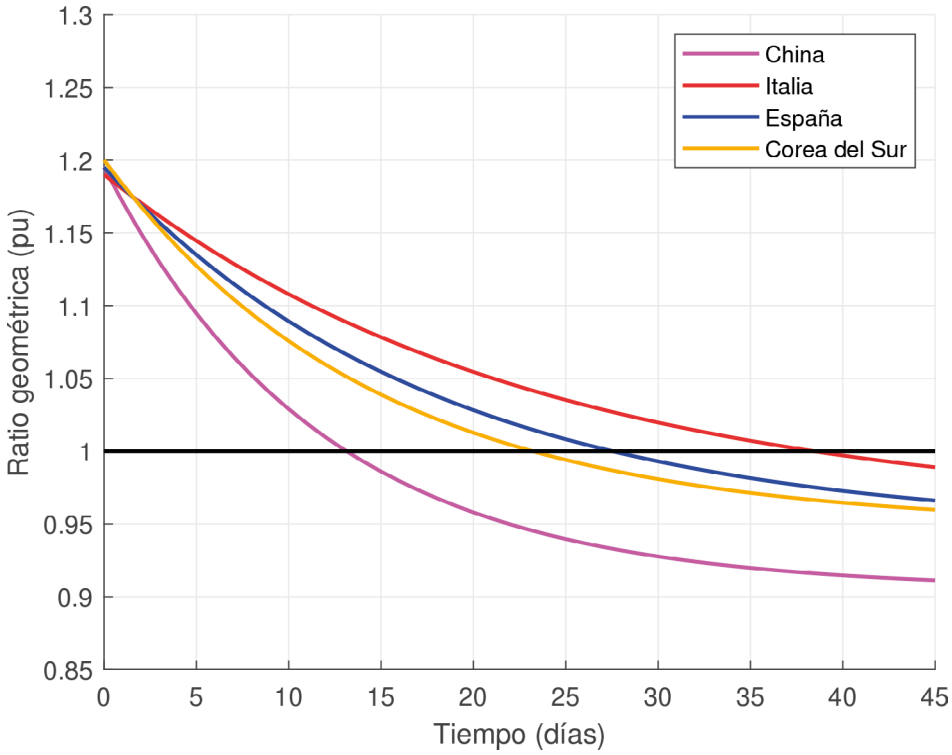


Figura 12. Curva exponencial ajustada con un origen de tiempo común

Desde este momento, se han vivido una serie de períodos (olas) con cierto carácter cíclico en los que el número de infectados crecía notablemente y con él, los fallecidos. A continuación, se va a presentar la evolución, desde el inicio de la pandemia, de la ratio geométrica de infectados estimada mediante filtro de Kalman. Esta representación se incluye en la figura 13, junto con el correspondiente número de personas infectadas por el virus.

Puede apreciarse en la representación gráfica que el número de infectados en la primera ola de la pandemia es notablemente inferior al de las sucesivas, siendo la sexta y última, con gran diferencia, la más agresiva en cuanto a número de contagios, por la aparición de nuevas variantes del virus con mayor facilidad de propagación.

A partir de la información en la figura 13 (derecha) se puede estimar un valor muy importante, como es el número total de personas infectadas por el virus en España, utilizando, como se mostró anteriormente, la relación entre el número de infectados activos, fallecidos totales y recuperados totales:

$$I_S(n) = I_a(n) + D_S(n) + R_S(n)$$

La curva monótona obtenida es la representada en la figura 14, donde se ha incluido además un segundo eje con el número de fallecidos totales. A modo de comparación, se han añadido datos estimados de infectados acumulativos obtenidos en otro estudio (Corominas 2021), que utiliza un modelo SIR de 3 compartimentos. Puede observarse que las discrepancias entre ambas estimaciones quedan dentro de las incertidumbres propias de ambos modelos, llegando incluso a coincidir en algunas etapas de la pandemia.

También se aprecia en la gráfica que los cambios en la pendiente del número de fallecidos son considerablemente más suaves que los mostrados en el número de infectados conforme avanza el tiempo, lo cual puede deberse a factores como el uso de mascarillas en exteriores, un mayor conocimiento y tratamiento médico del virus y sus síntomas, o la vacunación, cuyo efecto se estudiará en el siguiente apartado.

Por último, al igual que se hizo previamente para la primera ola de diferentes países (fig. 12), es posible comparar entre sí las seis olas que se han dado en España durante los dos años que ha durado la pandemia. Para ello, se selecciona en la figura 13 un intervalo de días alrededor del pico de cada ola y se realiza un ajuste de la ratio geométrica, $r(n)$, a una exponencial decreciente en cada uno de dichos intervalos. La figura 15 muestra las seis exponenciales resultantes en nuestro caso, para un intervalo de tiempo comprendido entre las 3 semanas antes del pico y las 3 semanas tras el pico. Para facilitar visualmente la comparación, se ha hecho coincidir en todas las curvas el paso por $r(n) = 1$ (pico de la ola).

Como puede apreciarse claramente, la velocidad de decaimiento de r(n) fue notablemente superior durante la primera ola de la pandemia, ya que en aquel momento las medidas adoptadas fueron mucho más restrictivas,

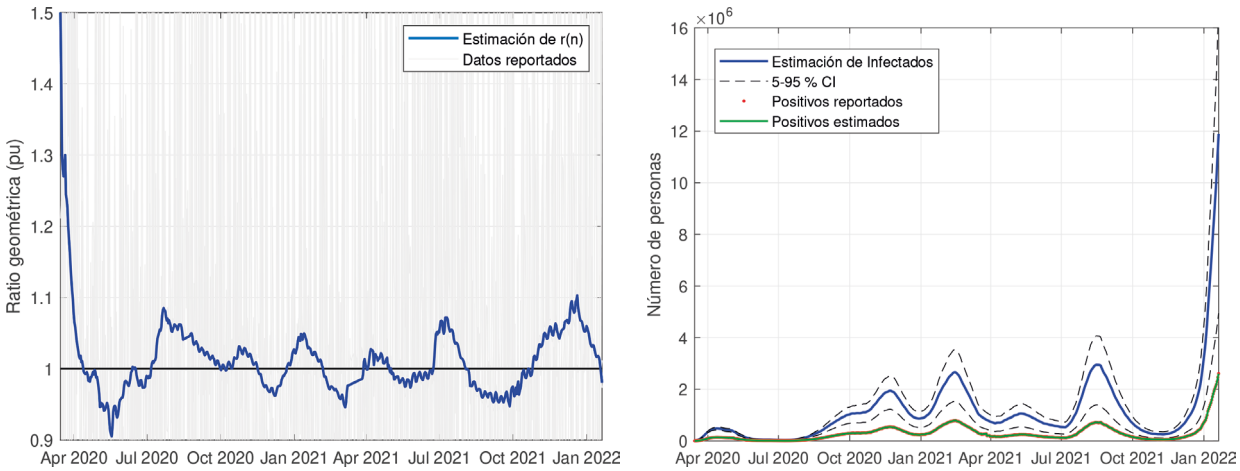


Figura 13. Estimación de ratio geométrica (izquierda) y del número de infectados activos (derecha) en España desde el inicio de la pandemia

principalmente el confinamiento domiciliario. El resto de las olas han evolucionado de forma bastante similar, si bien la cuarta ola ha sido algo más suave.

6. EFECTOS DE LA VACUNACIÓN

Sin lugar a duda, uno de los desarrollos más importantes de estos últimos tiempos ha sido la aparición de las vacunas contra la COVID-19. En este apartado va a plasmarse cómo ha afectado realmente este hecho a la evolución de la pandemia y a sus consecuencias en la población.

El inicio de la vacunación en España tuvo lugar en diciembre de 2020, comenzando por el personal sanitario más expuesto a los contagios y por las zonas con la población más vulnerable, como son las residencias de ancianos. De acuerdo con los datos extraídos de (Newtral 2022), el número total de dosis administradas es el que viene representado en la figura 16 (de nuevo otra curva sigmoidea).

Aunque las vacunas no eliminan totalmente el riesgo de contraer el virus, sí que han demostrado reducir notablemente la gravedad de los síntomas sufridos, disminuyendo por consiguiente la mortalidad de la enfermedad. Este aspecto se plasma en el cociente entre los infectados y los fallecidos, cuyo valor, en tanto por mil, puede verse representado en la figura 17.

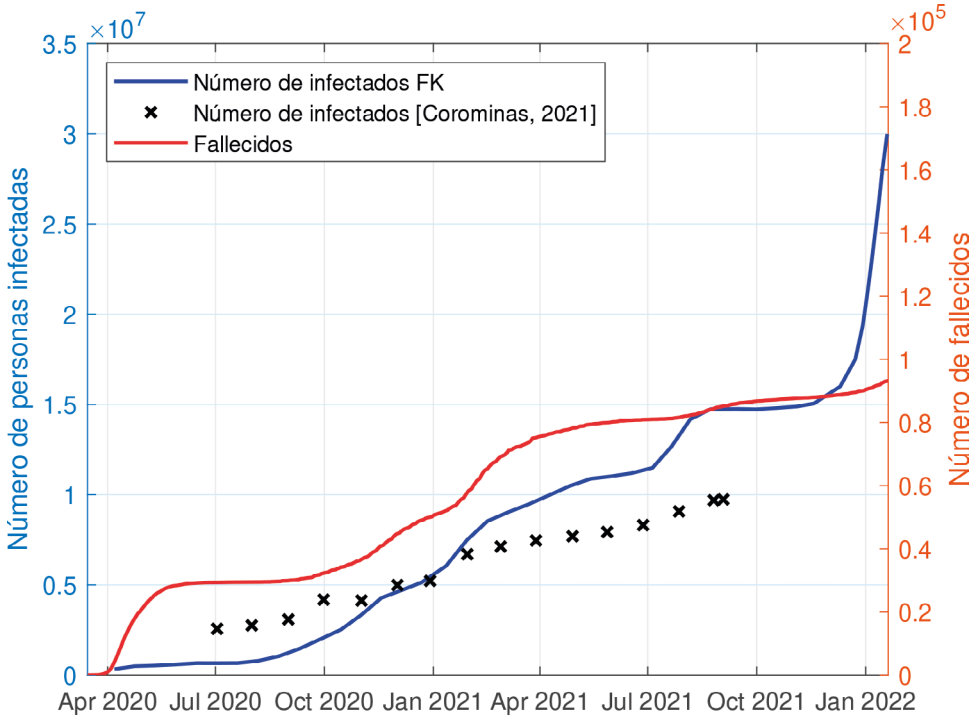


Figura 14. Estimación del número de infectados totales y número de fallecidos

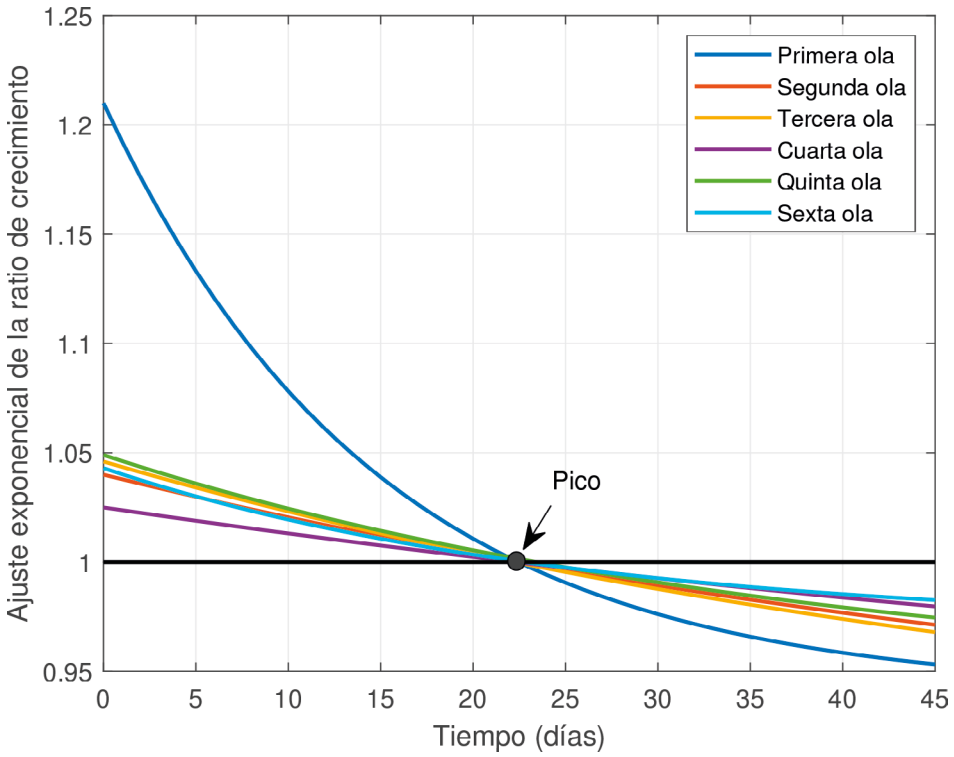


Figura 15. Curvas exponenciales ajustadas para las distintas olas de la pandemia en España

Como puede comprobarse, en la primera ola el cociente representado tomaba valores muy elevados, mientras que en la segunda y sucesivas olas esta relación es notablemente inferior, siendo muy reducida en la sexta ola de la pandemia.

La explicación de este fenómeno puede radicar no solamente en las medidas externas orientadas a la reducción de contagios, sino también en el mayor conocimiento de la enfermedad, que lleva a un tratamiento más eficiente de los contagiados.

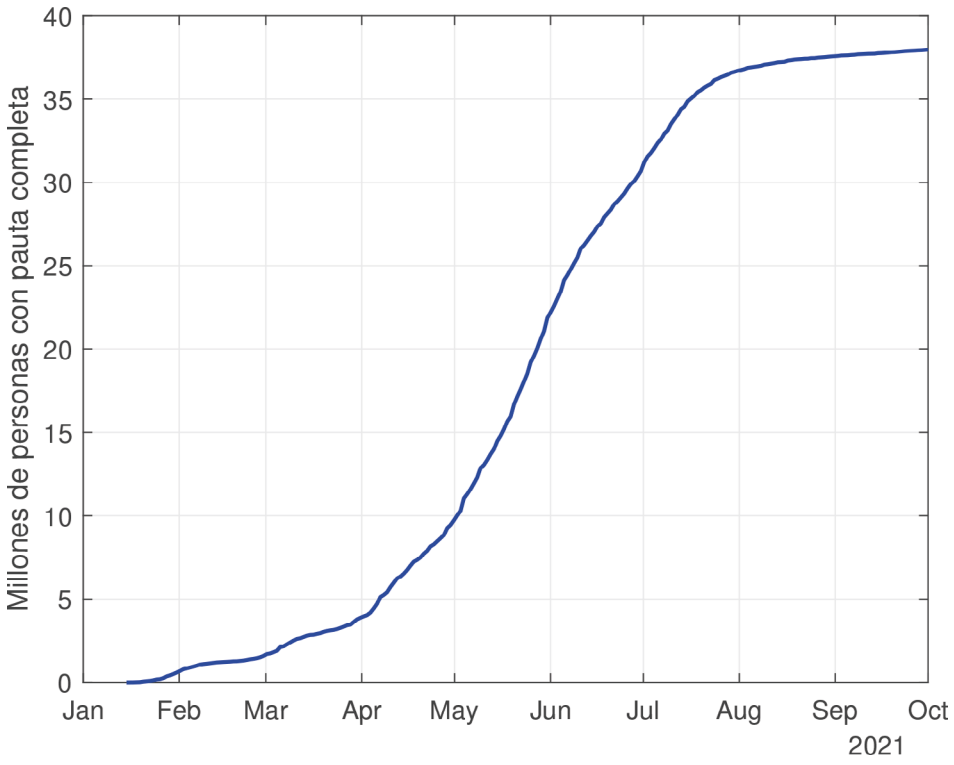


Figura 16. Evolución del número de personas vacunadas en España con la pauta completa

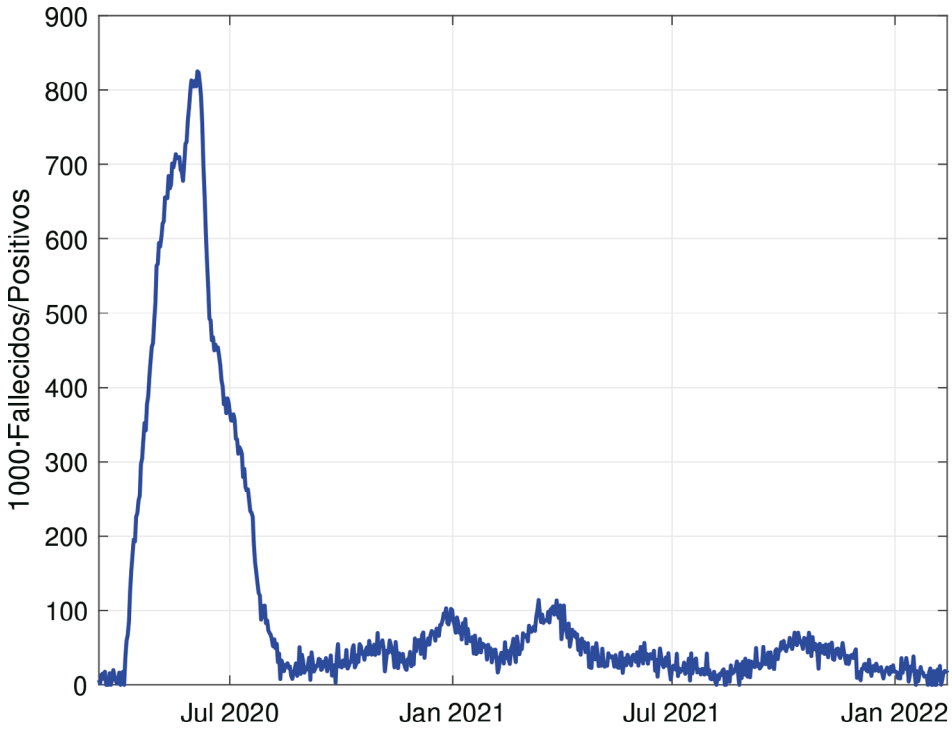


Figura 17. Relación entre el número de fallecidos y de positivos, en tanto por mil

Otro aspecto que ha tenido gran importancia a lo largo de estos meses es el número de días que tarda en promedio una persona en fallecer en caso de resultar infectada. Una forma de aproximar este número con los datos disponibles es encontrar el desfase, δ, que maximiza la correlación entre el número de fallecidos y el de positivos con el mencionado desplazamiento temporal. Este número se ha calculado en los tres primeros meses de pandemia, obteniendo un valor de 13-14 días, que coincide con los números arrojados por algunos estudios médicos de ese período de tiempo.

Repitiendo los cálculos anteriores, tomando esta vez los datos de los últimos tres meses, se obtiene un valor de 19 días, notablemente superior al estimado inicialmente. Este resultado pone en evidencia que las personas contagiadas eran más vulnerables a los efectos del virus durante los primeros meses de pandemia, reduciéndose este nivel de peligro por las diversas medidas adoptadas y por la reducción de la carga viral que propicia la vacunación de la población.

CONCLUSIONES

La utilización de modelos matemáticos y numéricos en la caracterización de la severidad y evolución de una pandemia resulta fundamental en las sociedades modernas, que necesitan estos instrumentos para evaluar la conveniencia de adoptar determinadas medidas de distanciamiento social, así como su duración, y planificar adecuadamente la utilización de los limitados recursos sanitarios existentes. Este capítulo no pretende realizar una revisión exhaustiva de todas y cada una de las herramientas y modelos considerados en la literatura, lo cual sería materialmente imposible en el espacio disponible. Los objetivos que nos hemos propuesto han sido más modestos, y pueden sintetizarse como sigue:

1. Familiarizar al lector no especialista con determinados conceptos o indicadores que han aparecido recurrentemente en los medios, a veces de forma confusa.
2. Hacer una taxonomía de las principales categorías de herramientas existentes, desde los métodos de análisis puramente estadísticos hasta las metodologías basadas en dinámica de sistemas
3. Llamar la atención sobre la conveniencia y simplicidad del uso de la razón geométrica de las series temporales, como alternativa al número de reproducción efectivo (R_t), cuya estimación resulta más compleja en base a los indicadores disponibles.
4. Describir la utilización de un filtro de Kalman no lineal sobre un modelo epidemiológico original basado en ratios, para estimar los principales parámetros que caracterizan la evolución de una epidemia, en particular la razón geométrica de los infectados activos, a partir de los indicadores habituales.
5. Ilustrar el uso de la razón geométrica para las series de datos reportadas en España durante los seis brotes pandémicos sufridos hasta la fecha.

Una de las conclusiones más destacadas de nuestras estimaciones es que, hasta finales de enero de 2022, el

número de infectados acumulados podría haber superado los 25 millones de personas, es decir, más del 50% de la población, consecuencia sobre todo de la sexta ola.

BIBLIOGRAFÍA

ALIMADADI, A., ARYAL, A., MANANDHAR, I., MUNROE, P.B., JOE, B. & CHENG, X. (2020), Artificial Intelligence and Machine Learning to Fight COVID-19, Physiological Genomics 52(4): 200-202.

LI, J., BLAKELEY, D. & SMITH, R.J. (2011), The Failure of R0. Computational and Mathematical Methods in Medicine 2011: 527610.

BIOCOMSC (2020), Analysis and Prediction of COVID-19 for Different Regions and Countries, UPC, disponible en línea en: https://biocomsc.upc.edu/en/covid-19/daily-report

COROMINAS, M, J. (2021), Aproximación del análisis estadístico de la pandemia del coronavirus en España. Disponible en línea en: http://www.pensamientocritico.org/aproximacion-al-analisis-estadistico-de-la-pandemia-del-coronavirus-en-espana-13-a-actualizacion-a-6-9-21/

DE LEÓN, M. & GÓMEZ CORRAL, A. (2020), Las matemáticas de la pandemia, Editorial CSIC y Catarata. ISBN: 978-84-00-10705-5.

EVENSEN, G. (1994), Sequential Data Assimilation with Nonlinear Quasi-Geostrophic Model Using Monte Carlo Methods to Forecast Error Statistics. Journal of Geophysical Research. 99 (C5): 143-162, May 1994.

GIORDANO, G., BLANCHINI, F., BRUNO, R. *et al.* (2020), Modelling the COVID-19 Epidemic and Implementation of Population-Wide Interventions in Italy, Nature Medicine 26: 855-860.

GITHUB (consultado por última vez en 2021), disponible en línea en: https://github.com/CSSEGISandData/COVID-9/tree/master/case_covid19_data/csse_covid19_time_series

GÓMEZ EXPÓSITO, A., ROSENDO MACÍAS, J.A. & GONZÁLEZ CAGIGAL, M.A. (2022), Monitoring and Tracking the Revolution of a Viral Epidemic through Nonlinear Kalman Filtering: Application to the COVID-19 Case, IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics 26(4): 1441-1452.

GREWAL, M.S. & ANDREWS, A.P. (2010), Applications of Kalman Filtering in Aerospace 1960 to the Present [Historical Perspectives]. IEEE Control Systems Magazine 30(3): 69-78.

IMPERIAL COLLEGE (2020), Impact of Non-Pharmaceutical Interventions (NPIs) to Reduce COVID19 Mortality and Healthcare Demand. Disponible en línea en: https://www.imperial.ac.uk/mrc-global-infectious-disease-analysis/COVID-19/report-9-impact-of-npis-on-covid-19

MADDEN, L.V. (1980), Quantification of Disease Progression. Protection Ecology; 2: 159-176.

NEWTRAL (consultado en 2020), disponible en línea en: https://www.newtral.es/estudio-de-seroprevalencia-un-5-de-espana-con-indicios-de-haber-pasado-covid-19/20200513/

NEWTRAL (consultado en enero de 2022), disponible en línea en: https://www.newtral.es/vacunacion-espana-covid/

PUEYO, T. (2020), Coronavirus: Why You Must Act Now. Disponible en línea en: https://medium.com/@tomaspueyo/coronavirus-act-today-or-people-will-die-f4d3d9cd99ca

RONDON-MORENO, C., ARROYO MARIOLI, F. & BULLANO, F. (2020) Dynamics of Transmission and Control of COVID-19: A Real-Time Estimation Using the Kalman Filter; https://doi.org/10.1101/2020.04.19.20071886

SANCHE, S., LIN, Y.T., XU, C., ROMERO-SEVERSON, E., HENGARTNER, N. & KE, R. (2020), High Contagiousness and Rapid Spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. Emerging Infectious Diseases 26(7): 1470-1477.

SIMON, D. (2006), Optimal State Estimation: Kalman, H Infinity, and Nonlinear Approaches, Wiley: Hooboken.

WORLDOMETERS (consultado en enero de 2022), disponible en línea en: https://www.worldometers.info/coronavirus/country/spain/

Capítulo IX
COVID-19, seguridad alimentaria y nutrición

Ana Canals Caballero
Dirección General de Salud Pública. Ministerio de Sanidad

Ana M. Troncoso González
Académica de número de la Academia Iberoamericana de Farmacia
Universidad de Sevilla

INTRODUCCIÓN

La irrupción de la pandemia COVID-19 provocada por el coronavirus 2 (SARS-CoV-2) y caracterizada por un síndrome respiratorio agudo ha sumido al planeta en una crisis de dimensiones extraordinarias. La enfermedad se caracteriza por alta morbilidad y mortalidad y elevada capacidad de transmisión. Además, ha supuesto una amenaza sin precedentes para la salud humana, los sistemas de atención médica, la vida pública y la economía. Salvar vidas y frenar la pandemia mundial fue la prioridad urgente. Se ha aprendido mucho, pero la COVID-19 sigue siendo una enfermedad relativamente nueva y la investigación sobre medidas preventivas y tratamientos continúa evolucionando. Durante la pandemia, ha habido un mayor interés clínico y público en el papel de la estrecha relación existente entre dieta y la salud, particularmente en el fortalecimiento del sistema inmune.

Desde el inicio de la pandemia existió preocupación por una posible transmisión del SARS-CoV-2 por los alimentos, tanto por parte de los consumidores como por las organizaciones europeas e internacionales que de forma muy temprana tuvieron que empezar a dar consejos a los ciudadanos y a los gobiernos para impedir la transmisión del virus en la mayor medida posible.

Aunque en las primeras semanas no existía suficiente evidencia científica, las experiencias de anteriores brotes de coronavirus afines, como el coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV) o el coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) podrían sugerir ausencia de transmisibilidad por la vía alimentaria.

El acuerdo general es que la vía principal de transmisión del SARS-CoV-2 es la respiratoria de persona a persona y que no se trata por tanto de una enfermedad transmitida por alimentos, una postura común entre las agencias y organizaciones encargadas de la evaluación de riesgos en seguridad alimentaria. Sin embargo, es también importante tener en cuenta determinadas publicaciones científicas que revisan los puntos más importantes que pudieran esclarecer una posible transmisión en base a alimentos y en los que hoy en día todavía hay abierto cierto debate. Entre estos aspectos están: el origen zoonótico de la enfermedad, su transmisión oral/fecal, la presencia del virus en aguas residuales, la supervivencia en superficies y medio ambiente y la resistencia del virus a congelación/refrigeración que favorecería que los alimentos fueran transportadores de partículas infectivas (Duda-Chodak *et al.* 2020; Lu *et al.* 2021; Jung *et al.* 2024).

Es evidente que una alimentación saludable es de particular importancia para prevenir toda una serie de enfermedades. Lo que comemos y bebemos puede afectar a la capacidad de nuestro organismo para prevenir y combatir las infecciones y para recuperarse de ellas. Las enfermedades infecciosas y en concreto las que afecta a las vías respiratorias constituyen desde antes de la pandemia por COVID-19 una de las principales causas de muerte en nuestro planeta (OMS 2020). Las personas con un sistema inmunitario comprometido pueden estar en mayor riesgo de sufrir complicaciones graves de la enfermedad, por ello es de gran interés conseguir un estatus nutricional adecuado en los nutrientes que contribuyen al correcto funcionamiento del sistema inmune.

A su vez, los confinamientos obligatorios durante la primera ola de la pandemia por la COVID-19 provocaron un fuerte impacto en todas las actividades de la vida, incluyendo la dieta.

En este capítulo se persigue recoger la evidencia acumulada hasta el momento en relación con el papel que juegan los alimentos y la dieta en la prevención de esta enfermedad infecciosa, así como en la recuperación de la misma.

1. EVALUACIONES DE RIESGOS SOBRE LA POSIBLE INFECCIÓN CON SARS-COV-2 A TRAVÉS DE LOS ALIMENTOS

El 9 de marzo del 2020 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA, incluyó en su página web la primera referencia a la infección con el SARS-CoV-2 que, a día de hoy, se ha mantenido sin cambios, en la que claramente se decía que «no hay pruebas de que los alimentos sean una fuente o una vía de transmisión del virus».

A pesar de que la pandemia de COVID-19 ha ocupado durante prácticamente dos años la actualidad de la población mundial, la EFSA y en quizás menos medida las otras agencias internacionales de seguridad alimentaria han sido escuetas y claras en esta afirmación. En la mayoría de los casos y dada la ausencia en los primeros meses de estudios específicos, esta afirmación estaba avalada por el hecho de que los coronavirus son virus respiratorios cuya transmisión es fundamentalmente aérea, por el conocimiento que había de la transmisión de otros coronavirus como el SARS-CoV-1, y el MERS, así como los coronavirus que producen resfriado común y por los estudios epidemiológicos iniciales de transmisión de SARS-CoV-2 (Otter *et al.* 2016; Azhar *et al.* 2019).

La Agencia Francesa de Seguridad Alimentaria (ANSES) fue una de las primeras en publicar una evaluación rápida de riesgos en marzo de 2020 (ANSES 2020); se le solicitaba contestar en 4 días a dos preguntas muy concretas; el posible papel de los animales domésticos en la infección de SARSCoV-2 así como el potencial de infección a través de los alimentos. ANSES expresa la misma opinión que la EFSA hizo pública en la página web descartando un papel relevante en la transmisión del virus tanto por los animales domésticos como de los alimentos, por supuesto en base a la evidencia científica disponible.

Estas mismas conclusiones se han publicado en forma de evaluaciones de riesgos parciales o generales, cuestionarios de preguntas frecuentes o estudios y posteriormente han sido ratificadas por distintas organizaciones internacionales y otras agencias de seguridad alimentaria europeas.

En abril de 2020 la FAO publica sus primeros mensajes sobre seguridad alimentaria y COVID-19 (FAO 2020) así como una guía encaminada a orientar a los operadores del ámbito alimentario en buenas prácticas. En la primera evaluación de riesgos de la FAO el mensaje apoyaba a los de las agencias europeas, otorgando muy poca probabilidad a una transmisión de COVID-19 a partir de los alimentos o de envases de productos alimenticios. Se cita en dicho documento que al ser la COVID-19 una enfermedad respiratoria que se transmite principalmente a través del contacto entre personas y del contacto directo con las gotículas expulsadas al toser o estornudar por una persona infectada, hasta esa fecha no se había demostrado que los virus que causan enfermedades respiratorias puedan transmitirse a través de los alimentos o de los envases que los contienen. Añadiendo que los coronavirus no pueden multiplicarse en los alimentos, pues necesitan un huésped animal o humano para hacerlo.

Sin embargo, la falta de suficiente evidencia científica en esos primeros meses y la aparición de publicaciones de supervivencia del virus en superficies y alimentos en condiciones controladas explica que, en esas primeras guías, la FAO apunta a la posibilidad de infección a través del contacto con superficies alimentarias y envases. De esa forma la FAO llama a las empresas alimentarias a intensificar las medidas de higiene personal y ofrecer cursos de formación a sus trabajadores acerca de los principios de la higiene alimentaria para evitar o reducir el riesgo de que contaminen la superficie de los alimentos o los envases con el virus. Se cita además el aislamiento de material genético (ARN) del virus de la COVID-19 a partir de muestras de heces de pacientes infectados, mencionando sin embargo la ausencia de casos notificados mediante infección por dicha vía o pruebas de transmisión fecal-oral. Dicho esto, la FAO vuelve a señalar la necesidad del lavado de manos como una práctica básica de higiene cuando se trabaja con alimentos.

La guía (FAO 2020) además proporciona una serie de recomendaciones en el ámbito de la industria alimentaria encaminadas a dar a conocer la COVID-19 a los trabajadores para evitar la propagación, el uso de guantes, procedimientos especiales para el transporte y entrega de alimentos o la venta de alimentos sin envasar en establecimientos. Todos hemos visto muchas de estas medidas implantadas en restaurantes, distribuidores y en general en todas las empresas alimentarias.

El (posible) origen zoonótico del SARS-CoV-2 y la percepción del riesgo inicial por una posible transmisión del virus de origen alimentario o por animales de producción o de compañía, induce a la FAO a realizar en ese mismo año (FAO 2020) una evaluación de riesgo cualitativa de la exposición al virus tanto de humanos como de animales por el manejo o consumo de animales domésticos, silvestres o animales acuáticos o sus productos. Dicha evaluación iba encaminada fundamentalmente a

mitigar el riesgo de exposición de personas y animales al SARS-CoV-2, a través de animales de producción, animales silvestres, acuáticos y de compañía. Dado que el virus SARS-CoV-2 penetra en las células a través de la unión de su proteína S (Spike) con la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ECA2), la estimación de la exposición se realizó en base a los estudios publicados de existencia de receptores ECA2 en diferentes especies animales y el potencial de afinidad de unión al receptor DUR receptor-binding domain (RBD) del SARS-CoV-2, en los casos en que existía dicha información. Sin embargo, estas estimaciones se consideran con incertidumbres medias/altas y pendientes de confirmar mediante estudios *ex vivo* de infección en células, o en animales de laboratorio y mediante pruebas procedentes de estudios exhaustivos epidemiológicos y de patología animal. Además, hay que tener en cuenta que dicha estimación únicamente evaluaba la exposición al virus y no la posibilidad de infección con el mismo a partir de estos animales, para lo cual en el propio estudio se aclara que requeriría el uso de otra metodología adicional.

La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) vinculada a la Unión Internacional de Sociedades Biológicas y a la OMS, publicó la opinión científica: «ICMSF opinion on SARS-CoV-2 and its relationship to food safety» (ICMSF 2020). La opinión reconoce la falta de estudios suficientes acerca de la presencia del virus SARS-CoV-2 en productos alimenticios, sus ingredientes o materiales de embalaje, pero coincide con lo ya expresado por EFSA y ANSES en referencia a la falta de evidencia científica que muestre la existencia de un riesgo para la salud humana debido a la presencia de SARS-CoV-2 en alimentos, embalaje o aguas residuales. No obstante lo anterior, la Comisión Internacional ICMFS considera que es prudente alertar a los productores, fabricantes y manipuladores de alimentos sobre la importancia de seguir usando buenas prácticas de higiene alimentaria, un aspecto básico de la seguridad alimentaria, para minimizar cualquier posibilidad de generar alimentos o superficies de contacto como vectores de SARSCoV-2. Se añade que dada la falta de evidencia que asocie los alimentos o sus materiales de envasado con la transmisión del SARS-CoV-2, no se recomienda realizar test sobre el producto final acabado o sobre muestras ambientales para la detección del virus del SARS-CoV-2 en base a seguridad alimentaria, al no aportar valor añadido para el mantenimiento de garantías de seguridad alimentaria en el contexto de la pandemia.

En agosto de 2021, casi año y medio después, la FAO publica una nueva versión de las guías para establecimientos alimentarios que actualiza la anterior en base a una mayor evidencia científica acumulada (FAO 2021). En estas guías se ratifica la baja probabilidad de transmisión de la COVID-19 a través de los alimentos o de sus embalajes. La FAO reconoce la existencia de estudios que describen la persistencia del SARS-CoV-2 en distintas superficies y que han documentado que el virus permanece viable hasta 72 horas en plásticos y acero inoxidable y hasta 24 horas en cartón (Van Doreman *et al.* 2020). Sin embargo, también concluye que la evidencia científica no indica que esa sea una ruta de transmisión significativa del SARS-CoV-2 o de cualquier otro virus respiratorio. Las guías siguen haciendo hincapié y actualizan la necesidad de tomar medidas en las empresas del sector alimentario encaminadas a disminuir la infección de los trabajadores en sus lugares de trabajo, reconociendo la trasmisión persona a persona la vía principal de infección, aunque menciona la posibilidad de una transmisión zoonótica de animales salvajes y domésticos a humanos. Se refuerza así mismo la necesidad de extremar las medidas de higiene y de protección individual y la distancia física.

El Instituto Nacional de Evaluación del Riesgo alemán (BfR) al igual que el resto de las autoridades de seguridad alimentaria es muy claro en afirmar que la transmisión de los coronavirus conocidos que afectan al ser humano mayoritariamente se produce por vía aérea en forma de gotas y partículas respiratorias muy pequeñas y que en base al conocimiento actual no existen evidencias de la infección de personas por SARS-CoV-2 proveniente de embalajes o alimentos (BfR 2021).

En resumen, se puede afirmar que la COVID-19 es una enfermedad respiratoria que se transmite de persona a persona. No es una enfermedad transmitida por los alimentos. No hay evidencia que sugiera que las personas se infecten por la presencia del virus en alimentos o bebidas.

2. ORIGEN ZOONÓTICO Y OTRAS ESPECIES SUSCEPTIBLES

Es bien conocida la capacidad de los Coronavirus de mutaciones que les permiten colonizar otras especies (Helmy *et al.* 2020). Cabe citar cuatro de ellos que se han convertido en endémicos en la población humana y causan principalmente infecciones leves en el tracto respiratorio superior; HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 y HKU1. A estos hay que añadir otros dos causantes de enfermedades de mayor gravedad y de origen zoonótico, como son el Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-CoV) y el Coronavirus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Hasöksüz *et al.* 2020).

Al igual que otros coronavirus el consenso científico apunta a que el SARS-CoV-2 comparte un origen zoonótico con otros coronavirus a partir del murciélago,

aunque sigue en discusión la existencia de otros hospedadores intermediarios, así como los posibles mecanismos que han propiciado que este agente zoonótico atravesara la barrera especie y colonizara al nuevo hospedador humano de un modo tan eficaz.

La mayor similitud genética (un 96,2%) del SARS-CoV2 se ha encontrado con el Bat-CoV-RaTG13, un virus aislado previamente en el Rhinolophus affinis (murciélago herradura) en la provincia de Yunnan (China) (Holmes *et al.* 2021). Sin embargo, la posibilidad de un hospedador intermediario se sugiere dadas las diferencias en la región RBD entre los virus aislados del murciélago y el de humanos que harían teóricamente muy difícil la transmisión directa desde este hospedador y el ser humano (Andersen *et al.* 2020). Este hecho ha llevado a sugerir que el nuevo coronavirus podría ser una cepa recombinante de un coronavirus procedente de murciélago y de alguna otra especie que haya actuado como hospedador intermediario (Do Vale *et al.* 2021).

La primera especie que se sugirió (Zhang y Holmes 2020; Zhang *et al.* 2020) fue el pangolín, tanto por su similitud genética como por haberse aislado algunos otros coronavirus tipo SARS-CoV en pulmón.

Las revisiones más recientes apuntan por tanto en la dirección de un origen zoonótico, un origen en el que los murciélagos de herradura de la especie *Rhinolophus affinis* parecían ser un reservorio natural, mientras que los pangolines (*Manis javanica*) podrían ser un huésped intermediario del coronavirus (Ahmed *et al.* 2021; Barh *et al.* 2020; Do Vale *et al.* 2021; Frazzini *et al.* 2022). Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido confirmar ninguna especie intermediaria que haya optimizado la capacidad del virus para adherirse a la ACE2 humana.

Algunos investigadores sugieren un origen no natural del SARS-CoV-2, sin embargo, sus conclusiones no parecen tener consenso ni estar claramente avaladas por la evidencia científica. Así las cosas, la OMS, en marzo de 2021, declaró que todas las hipótesis permanecían todavía abiertas. La identificación científica de este origen zoonótico y las especies implicadas continúa siendo fundamental en la investigación del SARS-CoV-2, una cuestión básica e imprescindible para la prevención de posibles futuras pandemias de similar naturaleza.

Es importante también revisar la infectividad del virus en determinadas especies animales, tanto domésticas como de compañía y su posible papel en la pandemia de la COVID-19 (Frazzini *et al.* 2022). Un caso particular ha sido el de las explotaciones de visones en 2020 y enero del 2021, el virus fue detectado en 400 explotaciones de visones de ocho Estados de la UE y el EEE: 290 en Dinamarca, 69 en los Países Bajos, 21 en Grecia, 13 en Suecia, tres en España, dos en Lituania, y una en Francia e Italia. A raíz de los primeros brotes en Dinamarca, la Comisión Europea solicitó a la EFSA una evaluación rápida de riesgos conjunta con el ECDC (Centro Europeo de Control de Enfermedades) que fue publicada en noviembre del 2020 (ECDC 2020), seguida de una publicación EFSA-ECDC en enero 2021 donde se detalla las medidas de monitorización.

El origen de esta incrementada epidemiología del SARS-CoV-2 en granjas de visones parece residir en la mezcla de dos factores; Los estudios realizados hasta la fecha indican que los visones, y los hurones también, resultan especialmente susceptibles a la infección por el SARS-CoV-2, y se ha probado que ambas especies pueden sufrir infección tanto experimental como natural. Además, las condiciones de cría de visones, en alojamientos abiertos y jaulas contiguas, la alta densidad dentro de estas granjas y la cercanía entre granjas favorecen la introducción de la infección por SARS-CoV-2 y su dispersión. Se ha confirmado posteriormente la transmisión del virus del visón a las personas (Munnink *et al.* 2020).

Los informes de la EFSA y el ECDC, pusieron de manifiesto la importancia de una detección temprana del SARS-CoV-2 en las granjas de visones de la Unión Europea y propone opciones para supervisar estrategias que ayuden a prevenir y controlar la propagación de esta enfermedad (Boklund *et al.* 2021). Este informe concluye que todas las granjas de visones deben considerarse en riesgo de SARS-CoV-2 y que el seguimiento debe incluir medidas activas como la realización de pruebas en animales y en el personal, además de la vigilancia pasiva por parte de ganaderos y veterinarios. A día de hoy millones de visones han sido sacrificados en granjas de todo el mundo para evitar que el virus encontrara en esta especie un reservorio natural y evitar mayor propagación y posibles mutaciones del virus.

En el caso de los hurones, a pesar de su incrementada susceptibilidad, la infección parece ocurrir solo cuando existe una alta circulación del virus en humanos en contacto con ellos y es poco probable que la circulación del virus se sustente en poblaciones de hurones pequeñas (Gortazar *et al.* 2021).

Además del caso de los visones en la última actualización de la OIE (OIE 2023) se describen 552 brotes en animales a nivel mundial, afectando a 29 especies en 36 países (fundamentalmente gatos, perros, hurones, grandes félidos en zoológicos y simios).

Al margen de estas consideraciones debe quedar claro que la principal vía de contagio del SARS-CoV-2 es de persona a persona. Es cierto que en el entorno de los pacientes con COVID-19 es fácil que esté contaminado con SARS-CoV-2, por lo que las mascotas que viven con personas infectadas están expuestas al virus y que el riesgo de exposición e infección de las mascotas con SARSCoV-2 que viven en hogares infectados, no

puede ser descartado. Aun así, este riesgo de exposición se considera bajo para gatos, hurones y hámsteres y muy bajo para perros y despreciable en pájaros y reptiles (Shi *et al.* 2021). No existe actualmente evidencia científica de que estas especies jueguen un papel en la transmisión del SARS-CoV-2 a los humanos.

3. TRANSMISIÓN ORAL-FECAL, AGUAS RESIDUALES Y ALIMENTOS MARINOS

Un tema imprescindible cuando se revisa la COVID-19 y la seguridad alimentaria es la posible transmisión e infección consiguiente del virus a través de las heces de pacientes infectados.

Es un hecho con consenso científico la presencia de virus en las heces de pacientes infectados, casi el 50% según algún estudio (Cheung *et al.* 2020), además parece haber evidencia de replicación viral en el epitelio intestinal y coincidentemente gran porcentaje de los pacientes de COVID-19 experimentan síntomas gastrointestinales (Quian *et al.* 2020; Wolfel *et al.* 2020), y existe también evidencia de infección de líneas celulares *in vitro* (Lamers *et al.* 2020; Zang *et al.* 2020).

Una posible transmisión oral de este virus requeriría la supervivencia del virus al pH del estómago, una hipótesis muy cuestionada, aunque se ha sugerido, utilizando un modelo con organoides, la posible infección en el epitelio gástrico sugiriendo así que el estómago puede jugar un papel importante en la transmisión oral-fecal (Giobbe *et al.* 2021). A pesar de ello al día de la fecha no se han encontrado pruebas sólidas de transmisión fecal-oral del SARS-CoV-2 en humanos (Termansen y Frische 2023). Si que está ampliamente reconocida la posibilidad de una transmisión respiratoria desde la cavidad oral o la faringe (Giacobbo*et al.* 2021; O'Brien *et al.* 2021), a pesar de estos estudios la existencia real de esta vía de transmisión no ha llegado a ser demostrada.

A pesar de que se han descrito viriones infecciosos en la literatura (Xiao *et al.* 2020), existen dudas de que exista suficiente virus infeccioso en las heces para de hecho contribuir a la infección por esa ruta (Pedersen *et al.* 2021). Sin embargo, todavía hay autores que defienden la existencia de una transmisión fecal-oral (Guo *et al.* 2021). Como hemos revisado está muy bien documentada la excreción de RNA viral en heces sin embargo no parece haber suficiente evidencia de que el virus retenga su infectividad y que por tanto esta sea una vía de infección real epidemiológica (Pedersen *et al.* 2021).

Está ampliamente documentada la presencia de SARS-CoV-2 en aguas residuales, es más la monitorización de SARS-CoV-2 en aguas residuales se ha constituido como un procedimiento muy valioso para estimar la presencia, prevalencia y circulación del virus en las poblaciones (Gawlik *et al.* 2021; Sangkham 2021) como complemento al seguimiento epidemiológico. A pesar de que hay descrita una posible supervivencia del virus en medios acuáticos que potencialmente podría implicar la dispersión de virus en esta matriz (Sala-Comorera *et al.* 2021), no existe evidencia clara de que exista virus infeccioso en estas matrices y que el agua o la contaminación con aguas fecales contribuyan a ser una ruta relevante de infección (Giacobbo *et al.* 2021).

Derivado de este tema es la posibilidad de infección alimentaria de SARS-CoV-2 a través de contaminación fecal de marisco y productos del mar. En este sentido, la falta de viabilidad extracelular del SARS-CoV-2, a pesar de una posible contaminación pasiva con virus de estos alimentos hace muy poco probable que el consumo de animales acuáticos o sus productos contribuya al desarrollo de COVID-19 en la población, y distintos autores recalcan el hecho de que el SARS-CoV-2 no es un virus transmitido por los alimentos y por tanto no debe gestionarse como tal (Godoy *et al.* 2021).

4. PRESENCIA Y SUPERVIVENCIA DEL VIRUS EN SUPERFICIES Y MEDIO AMBIENTE

Dado que el SARS-CoV-2 se transmite en gotas y aerosoles pudiendo estar presente en superficies parece evidente que los alimentos y sus envases podrían contaminarse con partículas virales a lo largo de la cadena alimentaria. La presencia, supervivencia e infectividad del virus en estas superficies inanimadas (fómites) ha sido objeto de numerosos estudios.

Otros coronavirus como el SARS-CoV-1 y el MERS-CoV han demostrada una alta supervivencia en superficies, hasta 9 días en algunos casos (Kampf *et al.* 2020). En el caso del SARS-CoV-2 también está demostrada una gran estabilidad dependiendo de las condiciones ambientales y la naturaleza de la superficie. En plástico se habla de 4 días, de 3 días en acero inoxidable, 8 días en cobre, y 3 días en papel (Dehbandi y Zazouli 2020). Estudios posteriores hablan de supervivencia del virus, en matrices fluidas y a temperatura ambiente, de hasta 21 días (Riddle *et al.* 2020).

Existen datos sobre la posible supervivencia del SARS-CoV-2 en matrices alimentarias (Jung *et al.* 2024) y se conoce la alta resistencia del virus a bajas temperaturas, incluidas las de refrigeración y congelación (Riddle *et al.* 2020; Duda-Chodak *et al.* 2020; Lu *et al.* 2021), lo cual favorecería que los alimentos fueran transportadores de partículas infectivas. Se han realizado muchos estudios sobre la viabilidad superficial del SARS-CoV-2 en diversas carnes, pescados y verduras congelados, que sugieren que el SARS-CoV-2 puede sobrevivir en la superficie de los alimentos congelados (Bailey *et al.* 2022).

Sin embargo, hasta esta fecha no se ha podido demostrar que la transmisión a través de superficies contaminadas del SARS-CoV-2 juegue un papel relevante en la propagación del virus.

Dada la alta supervivencia del virus, desde el principio de la pandemia se puso en evidencia la necesidad de extremar las medidas de higiene no solo en la cadena alimentaria sino en todos los ámbitos. Con otros coronavirus se ha comprobado la alta eficacia de tratamientos de inactivación química y térmica de higienización clásicos como son los compuestos alcalinos (pH mayor de 12) y ácidos (menor de 3), formaldehido, glutaraldehido, o por calor (más de 65 °C) (Darnell *et al.* 2004). La eficacia de estos tratamientos se ha confirmado también para SARS-CoV-2 (Pastorino *et al.* 2020; Auerswald *et al.* 2021) así como el uso de radiación ultravioleta (Gidari *et al.* 2021).

Ocasionalmente han aparecido citados en prensa brotes de COVID-19 en China con origen en matrices alimentarias congeladas provenientes de otros países, y se han publicado determinados estudios que apuntaban a este tipo de brotes, sin embargo estos estudios no parecen haberse confirmado, en algunos casos se han retirado (Fisher *et al.* 2021) y aunque algún estudio todavía incide en la posibilidad de transmisión del virus desde este tipo de matrices, se reconoce la falta de confirmación clínica y de laboratorio que conecte este tipo de matrices congeladas, presencia de SARS-CoV-2 infeccioso y posibles casos de COVID-19 (Chi *et al.* 2021; Jung *et al.* 2024).

Por otro lado, la transmisión del virus a partir de productos cárnicos no parece muy probable, sobre todo porque como ya hemos revisado la mayoría de los animales de cría para alimentación no se infectan con el virus, añadido al hecho que estos productos suelen cocinarse antes de consumirse. El consenso es que los «clusters» de infecciones en mataderos y otras empresas parecen estar favorecidos por el contacto cercano de los trabajadores que facilita la infección a partir de personas infectadas (Ursachi *et al.* 2021).

En cuanto a los animales de origen acuático, el SARS-CoV-2, como los otros Coronavirus de la familia se engloban dentro del género Betacoronavirus, y solo se ha descrito su infección en mamíferos. No hay evidencia hasta ahora que pueda sugerir que en la transmisión del SARS-CoV-2 jueguen ningún papel relevante en la infección tanto el pescado, crustáceos, anfibios o moluscos (Bondad-Reantaso *et al.* 2020). Además, tal como hemos visto anteriormente, tampoco se considera relevante el posible papel de los moluscos bivalvos como «portadores» de virus infeccioso proveniente de la contaminación de aguas con el virus.

5. MICRONUTRIENTES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS PARA EL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA INMUNE

En términos generales, una dieta completa, variada y equilibrada proporciona todos los nutrientes necesarios para el normal desarrollo y mantenimiento de un organismo sano.

Pero en circunstancias particulares, puede ser de interés una complementación con determinado nutriente o compuesto bioactivo. Es por ello por lo que a raíz de la irrupción de la COVID-19, no es de extrañar que se haya intensificado el estudio de la utilidad de ciertos nutrientes y sustancias para prevenir esta infección. Muchos de los factores de riesgo relacionados con la infección y la muerte por COVID-19 tienen asociaciones subyacentes con el estado nutricional (Galmés *et al.* 2020; Butler y Barrientos 2020). La deficiencia de la mayoría de los nutrientes aumenta la susceptibilidad del individuo a la infección por virus con una tendencia a la presentación clínica grave (Gasmi *et al.* 2020).

El sistema inmunitario es una red compleja de células y compuestos químicos que ayudan a defender el cuerpo contra las infecciones. Una serie de nutrientes están involucrados en el correcto funcionamiento de nuestro sistema inmunológico. En la tabla 1 se recogen los micronutrientes esenciales (vitaminas y minerales) que poseen una función en el mantenimiento de nuestro sistema inmunitario.

El Reglamento europeo de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables (Reglamento [CE] No. 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos) establece específicamente qué declaraciones pueden usarse en los alimentos y complementos alimenticios. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es el organismo independiente encargado de realizar las evaluaciones científicas previas a la autorización de las declaraciones de propiedades saludables. La Comisión Europea ha aprobado el uso de declaraciones de propiedades saludables a este respecto para el caso de las vitaminas A, B6, folato, B12, C, D, y los minerales zinc, selenio, hierro y cobre (EC 2021; Lockyer 2020). Como podemos comprobar en la tabla 1 estos micronutrientes se encuentran en una amplia gama de alimentos. Tener una dieta saludable y variada es la mejor manera de obtener todos los nutrientes que son importantes para el sistema inmunológico, así como para todos los demás sistemas del cuerpo.

Tabla 1. Micronutrientes con función en el sistema inmunitario y fuentes alimentarias

Micronutriente	Acciones en el sistema inmunitario	Alimentos
Vitamina A y carotenoides (provitamina A)	Estimula la proliferación de células T. Inhibe la proliferación de células B y precursores de células B. Suprime el desarrollo de T-helper 1 y mejora el desarrollo de T-helper 2. Regula la supervivencia y presentación de antígenos por células dendríticas inmaduras y la maduración de células dendríticas inmaduras a maduras. La deficiencia de vitamina A aumenta la inflamación mediada por macrófagos, pero afecta la capacidad de macrófagos para inactivar bacterias.	Huevos, hígado de animales de abasto (cerdo, vacuno), hortalizas (espinacas, zanahorias, calabaza), lácteos (queso, mantequilla)
Vitamina B6	Se requiere como coenzima en la producción de anticuerpos y citoquinas.	Frutos secos, legumbres, pescado azul, carne (pollo) e hígado de animales (cerdo, vacuno), huevo, cereales de desayuno, plátano, aguacate, soja
Folato (vitamina B9)	La deficiencia de folato reduce la proporción de células T circulantes y su proliferación.	Hígado de animales (cerdo, vacuno), legumbres, frutos secos, vegetales de hoja verde
Vitamina B12	Interactúa con la función inmune a través de su participación en la biosíntesis de ácido nucleico y proteínas (junto con vitamina B6 y ácido fólico).	Huevos, lácteos (queso), pescados, crustáceos y moluscos, carnes y vísceras
Vitamina C	Participa en la producción, diferenciación y proliferación de células T, particularmente células T citotóxicas. Promueve la proliferación de linfocitos, lo que resulta en una mayor generación de anticuerpos. Participa en la proliferación, función y movimiento de neutrófilos, monocitos, fagocitos; mantiene o mejora las actividades y la quimiotaxis de las células asesinas naturales; mejora la fagocitosis y generación de especies reactivas de oxígeno; mejora la destrucción microbiana; implicado en la apoptosis y eliminación de neutrófilos; atenúa la formación de trampas extracelulares, reduciendo así el daño tisular asociado. Los valores alterados de los parámetros inmunitarios que se observan en personas con niveles bajos de vitamina C pueden ser restaurados por la ingesta de vitamina C.	Frutas (cítricos, kiwi, frutos rojos, piña, papaya) y hortalizas (pimiento, tomates, vegetales genero Brassica, preferentemente crudas)
Vitamina D	Desempeña un papel regulador en el funcionamiento del sistema inmunitario y la respuesta antiinflamatoria. Reduce la respuesta inflamatoria de las células T-helper 1; suprime la presentación de antígenos por células dendríticas; suprime la proliferación y la producción de inmunoglobulinas y retarda la diferenciación de precursores de células B en células plasmáticas, ejerciendo una acción inhibitoria sobre el sistema inmunológico adaptativo. Aumenta la expresión de catelicidina (LL-37), un péptido antimicrobiano que se cree que es importante para el sistema inmunitario innato.	Pescado azul, yema de huevo, cereales de desayuno, lácteos enteros

Micronutriente	Acciones en el sistema inmunitario	Alimentos
Cobre	La enzima citocromo c oxidasa contiene cobre y se necesita para la producción de energía en las células inmunes. La enzima superóxidodismutasa contiene cobre e interviene en la protección de las células inmunes frente a las especies reactivas de oxígeno. Una deficiencia moderada o marginal de cobre afecta negativamente a la actividad de las células T. Las deficiencias severas de cobre modifican el perfil fenotípico de las células inmunes en sangre, médula y tejidos linfáticos. La deficiencia produce niveles anormalmente bajos de neutrófilos y atrofia del timo.	Cereales integrales, quinoa, moluscos, legumbres, aguacate, frutas desecadas, frutos secos, semillas
Hierro	Necesario para la producción y mantenimiento de células T efectoras. Liberación de citoquinas, balance entre citoquinas pro y antiinflamatorias.	Carnes rojas, vísceras, algunas legumbres (lentejas, alubias, soja, habas), frutos secos, algunos pescados (sardinas, calamar), moluscos y crustáceos, cereales integrales, frutas desecadas
Selenio	Estimula la proliferación de células T y linfocitos citotóxicos. Capacidad mejorada para destruir células tumorales. Incrementa la actividad de las células asesinas naturales.	Huevos, vísceras, carne, pescados y moluscos, frutos secos, cereales integrales
Zinc	La deficiencia de zinc da como resultado un nivel anormalmente bajo de linfocitos en la sangre y atrofia en el timo. Se asocia con una disminución en la mayoría de los aspectos de la función inmunológica, incluidas respuestas mediadas por anticuerpos, la producción de citoquinas por células mononucleares y la inducción de la apoptosis, lo que resulta en una pérdida de precursores de células B y células T en médula. La timulina es una enzima dependiente de zinc que estimula el desarrollo de células T dentro del timo. Un estatus adecuado de zinc es necesario para la función de las células asesinas naturales. La suplementación con zinc en humanos ha demostrado beneficio en las respuestas inmunitarias a bacterias y infecciones virales.	Carne, aves, queso, algunos mariscos (incluyendo cangrejo, berberechos y mejillones), frutos secos y semillas (en particular semillas de calabaza y piñones), cereales integrales para el desayuno panes con semillas

Adaptado de Cámara-Hurtado 2021 y Lockyer 2020

5.1. Complementos alimenticios

Hay circunstancias concretas en las que el aporte de nutrientes necesarios a partir de la dieta puede verse comprometido (personas mayores, aquellas que no toman el sol, embarazo, lactancia...). De acuerdo con lo establecido por la legislación europea (AESAN 2022), los complementos alimenticios se consideran legalmente alimentos cuyo fin es complementar la dieta normal. Consisten en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias con efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada (cápsulas, pastillas, tabletas, gotas, etc.). Son muchos los tipos de complementos alimenticios existentes a base de plantas, vitaminas, minerales y otras sustancias (jalea real, aminoácidos, etc.). A diferencia de los medicamentos, los complementos alimenticios no requieren autorización expresa para su venta. No obstante, las empresas responsables de la comercialización de complementos alimenticios en España tienen la obligación de comunicar expresamente la puesta en el mercado de su producto ante las autoridades competentes con el fin de facilitar su control (AESAN 2022). El etiquetado, la presentación y la publicidad de los complementos alimenticios no puede incluir ninguna afirmación que sugiera que una dieta equilibrada y variada no aporta por sí misma las

cantidades adecuadas de nutrientes en general. Además, no atribuirá a los complementos alimenticios la propiedad de prevenir, tratar o curar una enfermedad ni se referirá en absoluto a dichas propiedades.

Se precisan varias vitaminas y minerales, incluidas la vitamina C, la vitamina D y el zinc (tabla 1) para una función inmune adecuada, y las deficiencias clínicas de estos nutrientes pueden aumentar la susceptibilidad a las infecciones (Calder *et al.* 2020). Otros ingredientes de suplementos dietéticos, como los productos a base de plantas y los probióticos, no desempeñan funciones esenciales en el cuerpo, pero pueden afectar la función inmunológica. Un estudio observacional retrospectivo mediante encuesta con más de 300.000 personas involucradas ha mostrado (en Reino Unido, USA y Suecia) que el consumo de multivitaminas, probióticos, omega3 o suplementos de vitamina D durante los tres meses previos se asocia con una reducción en aproximadamente del 10% de infectarse por COVID-19 (Louca *et al.* 2021). Sin embargo, al tratarse de un estudio observacional no se puede inferir causalidad. Concretamente, la reducción del riesgo encontrada fue del orden de entre un 9 y un 14% si se tomaban complementos como probióticos, ácidos omega3, multivitaminas o vitamina D, respectivamente. Por el contrario, el riesgo no fue menor con vitamina C, zinc o suplementos con extracto de ajo. Hay que señalar que este estudio y otros similares no están exentos de posibles factores de confusión, el más reseñable es que las personas que consumen complementos alimenticios podrían estar más preocupadas por su salud y muy posiblemente, tienen hábitos más saludables. Además, han de tenerse en cuenta factores socioeconómicos, ya que quienes los consumen suelen pertenecer a sectores más privilegiados con mejores indicadores de salud en general.

Por ello, se puede afirmar que hasta ahora no hay evidencia de que una ingesta de vitaminas y minerales más allá de los requerimientos sea beneficiosa para obtener un plus de defensa inmune en individuos sanos. Los datos son insuficientes para respaldar las recomendaciones a favor o en contra del uso de cualquier vitamina, mineral u otro ingrediente botánico o ácido graso para prevenir o tratar la COVID-19.

En cualquier caso, el interés en los complementos alimenticios que podrían mejorar la función inmune y reducir la inflamación para ayudar a prevenir la COVID-19 o controlar sus signos y síntomas es alto. Muchos de estos ingredientes no se han estudiado en personas con COVID-19, pero las investigaciones sugieren que podrían mejorar la función inmune y ayudar a prevenir o reducir los síntomas del resfriado común, la gripe y otras infecciones del tracto respiratorio. Por lo tanto, algunos científicos creen que podrían ser prometedores para la COVID-19, aunque la solidez de la evidencia que respalda estas especulaciones varía ampliamente. Por ejemplo, muchos estudios han examinado las asociaciones entre las concentraciones séricas o plasmáticas de vitaminas o minerales y el riesgo de infección por COVID-19 o la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, es posible que las concentraciones de nutrientes en suero o plasma no reflejen las reservas corporales. Además, la aparición de enfermedades puede provocar concentraciones bajas (o a veces altas) de nutrientes. Además, muchos ensayos clínicos en pacientes con COVID-19 tuvieron muestras pequeñas, no fueron aleatorizados ni controlados con placebo y midieron múltiples resultados, lo que complica la interpretación de sus resultados.

5.2. Vitamina D

La vitamina D comprende dos compuestos biológicamente activos: ergocalciferol (vitamina D2) y colecalciferol (vitamina D3). La vitamina D2 se puede obtener a partir de nuestra dieta y solo está presente en determinados alimentos de origen vegetal como las setas o en el extracto de levadura. Podemos sintetizar vitamina D3 en nuestra piel, y ésta suele ser nuestra principal fuente de vitamina D para el organismo humano. Por otro lado, la vitamina D3 está presente en algunos alimentos de origen animal como el salmón, atún, queso o yema de huevo. La vitamina D2 y D3 se convierten en 25-hidroxivitamina D en el hígado, ésta es la principal forma circulante utilizada para medir el estatus en vitamina D porque tiene una vida media elevada en la sangre y refleja tanto la ingesta dietética como la síntesis en la piel. La conversión a la forma biológicamente activa (1,25-dihidroxivitamina D o calcitriol) ocurre en el riñón, de manera preferente, aunque esta forma está estrechamente regulada y es de corta duración. Podemos padecer una deficiencia de vitamina D cuando no nos exponemos lo suficiente a la luz solar, cuando no obtenemos o no absorbemos suficiente vitamina D de los alimentos, o cuando nuestros riñones no convierten adecuadamente la vitamina D en su forma activa. Pero más recientemente se ha puesto de manifiesto que otras células del organismo diferentes de las del riñón pueden también convertir a la vitamina en su forma activa.

La vitamina D, hoy considerada más una hormona que una vitamina, es bien conocida como vitamina liposoluble que es importante para mantener el equilibrio de calcio y fósforo en el cuerpo, el desarrollo de los huesos, la fuerza muscular y también el sistema inmune innato, siendo su función inmunomoduladora una de las más interesantes. El metabolismo de la vitamina es complejo, y supone mecanismos de activación y regulación (Buillon *et al.* 2019). La EFSA publicó una evaluación positiva para la vitamina D (EFSA 2010) afirmando que una

ingesta suficiente de la misma contribuye al normal funcionamiento del sistema inmune. La vitamina D estimula la producción de péptidos antimicrobianos potenciando así la inmunidad innata frente a infecciones bacterianas y virales y activa a los macrófagos que podrían destruir el SARS-CoV-2. Al mismo tiempo puede contribuir a evitar la tormenta de citoquinas disminuyendo su producción y manteniendo la integridad endotelial (Ku Kumar *et al.* 2021). La vitamina D parece reducir las tasas de replicación viral, suprimir la inflamación y aumentar los niveles y la actividad de células T reguladoras. Además, las células inmunitarias (p. ej., linfocitos B y linfocitos T) expresan el receptor de vitamina D, y algunas células inmunitarias (p. ej., macrófagos y células dendríticas) pueden convertir 25(OH)D en 1,25(OH)2D activo. Esta capacidad sugiere que la vitamina D podría modular las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas (National Institute of Health 2023).

Existen relativamente pocas fuentes alimenticias de vitamina D, ya que se encuentra naturalmente en pescado azul, yemas de huevo, y en menor cantidad en la carne y queso. Asimismo, podemos encontrar alimentos fortificados con vitamina D como algunas leches y productos lácteos, ciertas grasas para untar y algunos cereales para el desayuno.

Sin duda para conseguir unos niveles circulantes adecuados de vitamina D se precisa la irradiación solar de la piel. Las recomendaciones en países como España son exponer cara y brazos al sol durante 15 minutos al menos tres días a la semana. Niveles séricos de 25-hidroxivitamina D de al menos 50 nanomoles por litro (nmol/L), o expresado en nanogramos por mililitro (ng/mL), de al menos 20 ng/mL, reflejan un suministro adecuado. La mejor manera de lograr esto es a través de la síntesis propia de la piel. Con ello se consigue un suministro de vitamina D en un 80-90 por ciento. Además, se recomienda comer pescado azul, como el arenque o el salmón, una o dos veces por semana. Sin embargo, no todo el mundo alcanza niveles suficientes de vitamina D a través de la propia producción del cuerpo a partir de la exposición a la luz solar, caso especial son las personas mayores y aquellas que viven en latitudes norte en las que las horas de luz solar son limitadas, especialmente en invierno. La población europea en general y la española en particular consume de forma regular dietas adecuadas en contenido en nutrientes esenciales como las vitaminas y minerales, aunque hay algunas excepciones y una de ellas es precisamente la vitamina D. Se estima que la deficiencia en vitamina D (valores séricos de 25-hidroxivitamina D <50 nmol/L o 20 ng/mL) es común en Europa y afecta a menos del 20 % de la población del norte de Europa y entre 30-60 % en el resto, incluidos los países del sur como España. Una deficiencia severa (<30 nmol/L o 12 ng/mL) afecta a menos del 10 % de los europeos (Lips *et al.* 2019). En todo caso, existe un acuerdo general de que una concentración de 25-hidroxivitamina D de menos de 25-30 nmol/L debe evitarse para proteger la salud musculoesquelética.

Se debe señalar a su vez que varios estudios observacionales han demostrado funciones añadidas de la vitamina D, dado que valores más bajos de vitamina D se asocian con variadas patologías como diabetes, cáncer, depresión, enfermedades neurodegenerativas y por supuesto mayor riesgo de contraer infecciones, como es el caso de las infecciones agudas de las vías respiratorias (Monlezum *et al.* 2015).

La investigación preclínica señala que el virus SARS-Cov-2 penetra en las células a través de la enzima convertidora de la angiotensina 2, ECA2. A su vez la replicación del virus produce una desregulación del sistema renina angiotensina (RAS) provocando la tormenta de citoquinas y el síndrome respiratorio agudo. La investigación también ha mostrado como la vitamina D juega un papel importante equilibrando el sistema RAS, reduciendo el daño pulmonar (Xu *et al.* 2017). Hay cierta evidencia acumulada de que niveles bajos de la vitamina D en suero están asociados a un riesgo incrementado de infecciones respiratorias agudas, entre las que se incluye el COVID-19 pero la información que se tiene todavía es incierta. La mayoría de los estudios clínicos de vitamina D en COVID-19 han sido observacionales, y el problema más grave con el diseño de los estudios observacionales es el de los factores de confusión. Los estudios observacionales suelen evaluar la relación de los valores de 25(OH)D con los resultados de la COVID-19. Los valores séricos de 25-hidrovitamina D >50 nmol/L se han asociado con menores tasas de infección, así como menor gravedad de COVID-19 y mortalidad en estudios observacionales. Muchas condiciones asociadas con un estatus bajo de vitamina D también están asociadas con peores resultados de COVID-19. Un estudio llevado a cabo en España también encontró niveles más bajos de 25(OH)D, así como tasas más altas de deficiencia de vitamina D en 216 pacientes hospitalizados con COVID-19 que en 197 individuos sanos, aunque no encontró ninguna relación entre la gravedad de la enfermedad y los niveles de vitamina D o estado de deficiencia (Hernández *et al.* 2021). Se sugiere así que los niveles bajos de vitamina D circulante no actuarían como un factor causal, más bien se trataría de un signo de fragilidad, ya que son bajos cuando tienen lugar enfermedades que cursan con inflamación (Chiodini *et al.* 2021). Las personas que presentan niveles insuficientes de vitamina D tienen un riesgo aumentado de padecer enfermedades respiratorias agudas y se podrían beneficiar de suplementos de vitamina D (Chiodini *et al.* 2021).

Los ensayos de intervención controlados aleatorios superan el problema de la confusión y, por lo general, comparan los resultados entre los grupos que reciben suplementos de vitamina D o placebo. Sin embargo, cualquier beneficio de la vitamina D en la COVID-19 puede estar relacionado con la dosis, la duración, la administración diaria frente a la administración en bolo, la interacción con otros tratamientos y el momento de la administración antes o durante la enfermedad. Se han realizado varios ensayos clínicos administrando vitamina D como tratamiento y no como prevención, es decir empleando dosis farmacológicas, lejos de las dietéticas. Así la suplementación con vitamina D se menciona como un tratamiento potencialmente interesante para la infección por SARS-CoV-2 pero sobre una base científica con un nivel de evidencia limitado hasta el momento. Otros estudios proponen la suplementación con dosis altas de vitamina D en orden a mejorar el pronóstico de los pacientes mayores diagnosticados con COVID-19 en comparación con una dosis estándar de vitamina D (Annweiler *et al.* 2020; Entrenas *et al.* 2020; Murai *et al.* 2021).

Sin embargo, los beneficios para personas con niveles adecuados de vitamina D son mucho más dudosos e inciertos y no han podido ser probados. Por ello, no se puede recomendar a la población en general que para prevenir enfermedades respiratorias infecciosas se deban consumir complementos que contengan vitamina D, como lo señalan las agencias de seguridad alimentaria y organismos sanitarios (Pérez-Castrillón *et al.* 2020; SACN 2020; BfR 2020).

La ingesta adicional de vitamina D puede ser apropiada para ciertos grupos de personas, especialmente durante los meses de invierno. Aquellos que quieran complementar la vitamina D deben recurrir a los complementos alimenticios con hasta 20 microgramos (µg) de vitamina D (800 unidades internacionales, UI) por día, ya que esta dosis no está asociada con ningún problema de salud. Los complementos alimenticios pueden ser especialmente adecuados para un grupo de riesgo que incluye personas que dedican poco o ningún tiempo al aire libre o, por ejemplo, los que, por motivos culturales o religiosos, solo salen con el cuerpo completamente cubierto. Además, las personas de piel oscura pertenecen a los grupos de riesgo, ya que producen menos vitamina D que las personas con piel clara que tienen menor concentración de pigmento melanina en la piel. Otro grupo de riesgo importante incluye a las personas mayores porque la formación de la vitamina D disminuye significativamente con la edad. También en este grupo de edad hay a menudo individuos con movilidad limitada, con enfermedades crónicas o que necesitan atención, que no pueden pasar tiempo al aire libre o pasan muy poco tiempo al aire libre. Por lo tanto, la deficiencia de vitamina D puede estar particularmente extendida entre los residentes de hogares para personas mayores. Para este grupo de riesgo, se debe considerar la suplementación general. Paralelamente a la suplementación, los niveles séricos deben controlarse periódicamente. Un buen número de países con menor número de horas de sol al año como Reino Unido recomiendan a la población que considere tomar una cantidad adicional de vitamina D diaria en forma de complemento alimenticio a dosis de 10 µg [400 IU] durante los meses de invierno (de octubre a marzo), ya que es difícil obtener la cantidad adecuada únicamente a través de los alimentos (NHS 2020).

La EFSA (EFSA 2012) ha propuesto un nivel de ingesta superior tolerable (UL) de 100 µg/día (4000 UI) para la vitamina D para adultos y niños mayores de 11 años. Este nivel se refiere a la ingesta máxima a partir de alimentos y complementos alimenticios y no representa una recomendación de ingesta. Una ingesta diaria regular de vitamina D por encima de la UL aumenta el riesgo de efectos adversos, como la formación cálculos en el riñón. En el contexto de los hábitos dietéticos habituales, actualmente esto solo es posible tomando suplementos de vitamina D en dosis elevadas.

Como resumen, se puede afirmar que unos niveles adecuados de vitamina D se pueden conseguir a través de la dieta, el sol y los complementos alimenticios, en caso necesario. La población que tiene niveles adecuados de vitamina D circulantes no se beneficiará de ingestas adicionales en orden a reforzar su sistema inmune, por lo que no se puede recomendar de forma general a la población una suplementación, más allá de poblaciones y situaciones concretas.

Por ello podemos decir que la recomendación de ingesta de la vitamina D no ha cambiado como resultado de la pandemia de COVID-19. Sin embargo, se hace necesario recordar a la población el interés de considerar la suplementación con vitamina D, incluso durante los meses de primavera y verano, si el tiempo al aire libre es limitado.

Por último, aunque no todos los datos son uniformes, sí parece observarse una relación, no necesariamente causal, entre deficiencia de vitamina D y la incidencia y mortalidad por COVID-19. Son necesarios ensayos clínicos bien diseñados y a gran escala con suplementos de vitamina D dirigidos particularmente a aquellos con bajos niveles de partida de concentraciones circulantes, a fin de poder establecer una relación causal entre un estado bajo de vitamina D y un mayor riesgo de infección por COVID-19 y riesgo de mortalidad. Se han realizado varios ensayos clínicos con suplementos de vitamina D, como el estudio CORONAVIT en la Universidad Queen Mary de Londres (Jolliffe *et al.* 2022), que encontró que un tratamiento para corregir el estado subóptimo de

vitamina D en la población del Reino Unido fue seguro y efectivo para aumentar las concentraciones de 25(OH)D en 6200 personas de 16 años o más con concentraciones iniciales de vitamina D <75 nmol/L. Sin embargo, esto no se asoció con la protección frente a infección aguda del tracto respiratorio por todas las causas o COVID-19.

5.3. Zinc

El zinc es un mineral esencial involucrado en una variedad de procesos biológicos debido a su función como cofactor, molécula señalizadora, y elemento estructural. Regula la actividad inflamatoria, tiene funciones antivirales y antioxidantes. El zinc es capaz de modular la inmunidad antiviral y antibacteriana así como la respuesta inflamatoria. Factores de riesgo para COVID-19 como el envejecimiento, la obesidad, la diabetes, la aterosclerosis y la inmunosupresión también son factores relacionados con la deficiencia de zinc (Skalny *et al.* 2020). Los alimentos ricos en zinc son el pescado, los mariscos, el huevo, la carne, los frutos secos y semillas, cereales integrales y legumbres. Los derivados de cereales refinados carecen de zinc. La biodisponibilidad del zinc es mayor cuando se obtiene de fuentes animales en comparación con fuentes vegetales y además depende de la composición de la dieta en su conjunto. Los fitatos, así como ciertas fibras y la lignina pueden unirse al zinc y, por lo tanto, reducir su absorción. Los fitatos están mayoritariamente presentes en alimentos vegetales como productos de cereales sin refinar y legumbres. Además, una alta ingesta de calcio o hierro puede interferir con la absorción de zinc (Santos *et al.* 2020).

El zinc participa en numerosos aspectos del metabolismo celular. Es necesario para la actividad catalítica de aproximadamente 100 enzimas y desempeña un papel en muchos procesos incluidos los sistemas inmunológicos innato y adaptativo. También tiene propiedades antivirales y antiinflamatorias y ayuda a mantener la integridad de las barreras tisulares, como los epitelios respiratorios.

Un estudio observacional con 249 pacientes (edad media 65 años) afectados por COVID-19 ingresados en un hospital en España encontró que los pacientes con niveles séricos de zinc inferiores a 50 mcg/dL padecían una enfermedad más grave al ingreso, tardaron más en recuperarse (mediana de 25 vs. 8 días), y tuvieron tasas de mortalidad más elevadas (21 % frente a 5 %) que aquellos con niveles más altos de zinc (Vogel-González *et al.* 2021).

Por otro lado, el uso del Zn en el tratamiento para la infección por SARS-CoV-2 se basa en varios supuestos: 1) el posible papel de la actividad antiinflamatoria de Zn en la respuesta inflamatoria desencadenada por el COVID-19; 2) propiedades de Zn en la modulación del equilibrio competitivo entre el huésped y los patógenos invasores; y 3) la actividad antiviral de Zn en una serie de patógenos, incluidos los coronavirus. Aparte de su papel en las funciones inmunitarias, el zinc ha demostrado actividad antiviral directa para una serie de virus de ARN inhibiendo eficientemente la replicación del SARS-CoV-2 en cultivos celulares (Mossink 2020). Los ensayos llevados a cabo hasta el momento son bastante limitados y no se pueden extraer conclusiones acerca de la utilidad de este mineral en mejorar el curso de esta enfermedad. Los resultados de algunos estudios de cohortes y ensayos clínicos que evaluaron el uso de zinc en pacientes con COVID-19 se han publicado en revistas revisadas por pares. Sin embargo, la mayoría de estos estudios tienen limitaciones importantes, como tamaños de muestra pequeños o falta de aleatorización o placebo. Además, estos estudios utilizaron diferentes dosis y formulaciones de zinc, inscribieron a participantes con una variedad de agravamiento de COVID-19, incluyeron diferentes medicamentos concomitantes y midieron diferentes resultados. Todos estos factores dificultan una comparación adecuada de estos estudios. Debido a que no se ha demostrado que el zinc tenga un beneficio clínico y pueda ser dañino, la mayoría de los Organismos recomiendan no usar suplementos de zinc por encima de la cantidad dietética recomendada para la prevención de COVID-19, excepto en un ensayo clínico.

5.4. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que pueden proporcionar beneficios para la salud cuando se consumen en cantidades adecuadas (Hill *et al.* 2014). Hay muchos tipos de probióticos y se pueden encontrar en algunos alimentos fermentados, como el yogur. Los probióticos también se pueden encontrar en el mercado como complementos alimenticios. El papel de los probióticos en la regulación del sistema inmunitario ha sido objeto de una investigación muy intensa en los últimos años. La evidencia clínica muestra que ciertas cepas de probióticos ayudan a prevenir infecciones bacterianas y virales, incluidas la gastroenteritis, la sepsis y las infecciones del tracto respiratorio. Los probióticos actúan principalmente en el tracto gastrointestinal y podrían mejorar la función inmune de varias maneras, incluida la mejora de la función de la barrera intestinal, el aumento de la producción de inmunoglobulinas, la inhibición de la replicación viral y la mejora de la actividad fagocítica de los glóbulos blancos. Sin embargo, los mecanismos de sus efectos potenciales sobre la función inmune no están claros. Además, los hallazgos de la investigación para una cepa de probióticos no se pueden extrapolar a otras. Así pues, la evidencia basada en la causalidad de que los probióticos

pueden proporcionar estos beneficios para la salud no es muy sólida por el momento.

La irrupción de la pandemia por COVID-19 ha hecho que se intensifique el estudio acerca del posible papel de ciertas cepas de probióticos en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad. Cabe señalar que no todos los probióticos, incluso aquellos con beneficios gastrointestinales, contribuyen necesariamente a reducir el riesgo de infección respiratoria. Por ejemplo, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis que están normalmente asociados a lácteos fermentados pueden contribuir a los beneficios intestinales, pero no reducen la cantidad de virus en la nasofaringe (Baud *et al.* 2020).

La COVID-19 puede producir importantes alteraciones en el microbioma intestinal. Así los probióticos se han considerado una intervención potencial tanto para el tratamiento como para la prevención de enfermedades. Los resultados de los estudios llevados a cabo han sido variables, pero parece haber algún beneficio en el uso de probióticos en el entorno de infección y exposición a COVID-19. Específicamente, un estudio de cohorte retrospectivo mostró una reducción significativa en la duración de la hospitalización, el tiempo hasta la mejoría clínica y tiempo hasta la negatividad de COVID-19 en aquellos que recibieron un probiótico (Bell *et al.* 2023). Múltiples estudios también han demostrado una reducción de la duración de la diarrea en quienes reciben tratamiento con probióticos después de dar positivo por COVID-19. Los probióticos son medicamentos bien tolerados sin efectos secundarios significativos o perfiles de reacciones adversas. Por esta razón, parece ser un argumento a favor del uso de probióticos en el contexto de la infección.

Algunas cepas de probióticos pueden reducir la multiplicación de virus y mejorar la producción de anticuerpos. En general, la modulación de la microbiota intestinal puede controlar de forma positiva la progresión de la enfermedad por COVID-19 (Xavier Santos *et al.* 2022). Investigaciones recientes han mostrado cómo las complicaciones relacionadas con el SARS-CoV-2, especialmente la dificultad respiratoria, pueden controlarse mediante la administración de ciertos probióticos. El intestino y el pulmón son órganos que comparten una relación, ya que son capaces de influir en la respuesta inmune y los procesos inflamatorios a través del denominado eje intestino-pulmón y ambos podrán responder a tratamientos con probióticos. Recibir probióticos a través de alimentos fermentados probablemente parece ser seguro y eficiente en la prevención de enfermedades virales. Pero en cualquier caso se necesitan ensayos controlados aleatorios que fortalezcan y evidencien estas conclusiones preliminares (Mirashrafi *et al.* 2021; Xavier-Santos *et al.* 2022).

6. GUÍAS PARA UNA ALIMENTACIÓN SALUDABLE EN TIEMPOS DE COVID. RECOMENDACIONES DIETÉTICAS

6.1. Obesidad y COVID

Se ha acumulado ya bastante evidencia acerca de la obesidad y la mayor predisposición a padecer la enfermedad y sus secuelas (Michalakis *et al.* 2021). La obesidad, la distribución corporal de la grasa a nivel central y las enfermedades crónicas asociadas a la adiposidad, por ejemplo, diabetes mellitus y enfermedades cardiometabólicas pueden conducir a una evolución desfavorable de la enfermedad por COVID-19 (Sattar *et al.* 2020). Así, se sabe que el SARS-CoV-2 entra en las células cuando una proteína de su envoltura, la llamada spike o proteína S viral, se une a la enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ACE2), proteína de la membrana de varios tipos de células humanas. La expresión de estas moléculas de membrana en el tejido adiposo se ve aumentada en el caso del fenotipo obeso, lo que implica que la grasa es un reservorio para el virus, que es capaz de permanecer en el cuerpo de los pacientes con obesidad durante más tiempo. Además, en modelos animales de obesidad (Al Heialy *et al.* 2020) se ha observado que la ACE2 también aumenta en las células pulmonares, favoreciendo la entrada de partículas virales en el epitelio pulmonar. Las personas con obesidad presentan un estado inflamatorio crónico de bajo grado que activa una respuesta inmune local con producción de sustancias proinflamatorias. Este déficit inmune, junto con la situación previa de inflamación, puede ampliar la conocida tormenta de citoquinas desencadenada tras la infección viral, produciendo un empeoramiento de los síntomas. Asimismo, el exceso de grasa abdominal de las personas obesas puede dificultar el correcto movimiento del diafragma durante la respiración, reduciendo la capacidad pulmonar y generando dificultades que predisponen al desarrollo de infecciones respiratorias. Una vez más se comprueba cómo la obesidad es factor de riesgo para el desarrollo de una patología, en este caso infecciosa con graves consecuencias para la salud (Petrova *et al.* 2020). La obesidad, a su vez, está estrechamente relacionada con un nivel socioeconómico más bajo y hábitos de vida, siendo la mala alimentación uno de los factores que más contribuye, basándose en un trasfondo genético dado.

6.2. Cambios en los hábitos alimentarios y dietéticos durante el período de confinamiento

La evidencia sobre la elevada transmisibilidad de persona a persona del SARS-CoV-2 hizo que el aislamiento

social fuera una de las más efectivas medidas de prevención para evitar la propagación de la COVID-19. Así las condiciones impuestas por la pandemia especialmente durante el período de obligado confinamiento con importantes restricciones a la movilidad, los cierres o la limitación de los horarios de los mercados de alimentos y los aumentos de los precios de los alimentos perecederos, llegaron a provocar cambios en los hábitos alimentarios en numerosos países. Estas condiciones, junto con unos ingresos reducidos debido al gran impacto económico, pudieron suponer una elección de alimentos más baratos, altamente procesados y con mayor vida útil, que a menudo poseen una densidad calórica elevada y un valor nutricional mínimo, en lugar de alimentos frescos y más nutritivos.

Una revisión sistemática (Mignogna *et al.* 2021) sobre el impacto de los confinamientos en la primera ola por la COVID-19 recoge cuestiones relacionadas con la ingesta de alimentos, las conductas alimentarias y la calidad de la dieta global en diferentes países. La mayoría de los estudios fueron encuestas basadas en la web que utilizaron un muestreo de conveniencia, centrado principalmente en las variaciones en el consumo de alimentos y los comportamientos alimentarios durante el confinamiento. Partiendo de la definición de dieta saludable reflejada en la dieta mediterránea tradicional, se observó en general un aumento del consumo de los alimentos recomendados como frutas y verduras, legumbres, cereales y aceite de oliva, aunque se registró una fuerte disminución del consumo de pescado y un aumento de los productos lácteos. Al mismo tiempo en muchos países tuvo lugar una reducción en los alimentos que deben consumirse con menos frecuencia, a saber, carne roja y procesada. Sin embargo, también se observó un mayor consumo de alimentos poco saludables (por ejemplo, bocadillos y dulces). Los resultados indicaron una mejor calidad de la dieta en Europa, especialmente entre los países mediterráneos, con la excepción de Francia. Los análisis de los comportamientos alimentarios sugieren un aumento en la ingesta total de alimentos, el número de comidas diarias y las comidas entre horas. En el caso concreto de España se han llevado a cabo un buen número de estudios (Sánchez *et al.* 2021; Rodríguez-Perez *et al.* 2020; Sánchez-Sánchez *et al.* 2020; López-Moreno *et al.* 2020; Romero-Arroyo *et al.* 2020; Aguilar-Martinez *et al.* 2021; Pérez-Rodrigo *et al.* 2020) para investigar el cambio en el comportamiento durante la cuarentena, y sus resultados son en general concordantes con lo anteriormente expuesto, aunque puede haber diferencias significativas en función de las características de la población encuestada. A medida que aumenta el nivel socioeconómico y de estudios de los participantes en la encuesta la adherencia a dieta mediterránea suele ser mayor.

6.3. Alimentación saludable en tiempos de COVID-19

Está bien establecido que el estado nutricional juega un papel importante en la función inmune y que las condiciones metabólicas específicas (p. ej., obesidad y diabetes) se asocian con un mayor riesgo de secuela grave por COVID-19. Es pues razonable considerar el papel que juega la composición dietética diaria en el riesgo de infección por COVID-19 y su gravedad. Respecto a la dieta, podemos decir que actualmente no existen pruebas convincentes de alimentos o patrones dietéticos que puedan estimular nuestro sistema inmunológico y prevenir o tratar la COVID-19, si bien como hemos visto determinados micronutrientes juegan un papel importante en nuestro sistema inmunológico. En general, existe consenso entre los diferentes organismos, asociaciones científicas y agencias al recomendar una dieta sana y equilibrada rica en alimentos de origen vegetal que nos permita obtener estos nutrientes a través de nuestra alimentación (EUFIC 2020; Academia Española de Nutrición y Dietética 2020; De Faria Coello-Ravagnani *et al.* 2021). Las dietas saludables protegen de la malnutrición en todas sus formas, incluidas las enfermedades no transmisibles como, por ejemplo, la diabetes, las cardiopatías, los accidentes cerebrovasculares y el cáncer. Contienen una selección equilibrada, variada y adecuada de los diferentes alimentos para asegurar la satisfacción de las necesidades de macronutrientes (proteínas, grasas e hidratos de carbono y fibra dietética) y micronutrientes esenciales (vitaminas y minerales como el zinc y las vitaminas C, D, A) de cada individuo según el género, la edad, el nivel de actividad física y el estado fisiológico. Asimismo, es conveniente mantener un adecuado nivel de hidratación. Las dietas saludables incluyen menos del 30 % del aporte energético total procedente de grasas, con un cambio en el consumo de estas que se aleja de las grasas saturadas y se orienta a las grasas insaturadas y la eliminación de las grasas trans industriales; menos del 10 % del aporte energético total procedente de azúcares libres (preferiblemente menos del 5 %); un consumo de al menos 400 g de frutas y hortalizas al día; y menos de 5 g diarios de sal. Aunque la composición exacta de una dieta equilibrada varía en función de las características individuales, así como del contexto cultural, los alimentos disponibles a nivel local y los hábitos alimentarios, los principios básicos de lo que constituye una dieta saludable son los mismos (OMS 2020).

Por lo tanto, resulta muy adecuado seguir unos hábitos dietéticos saludables frente a la COVID-19 (fig. 1), como se indica en las recomendaciones nutricionales publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2020; OMS-Europa 2020) así como por las asociaciones

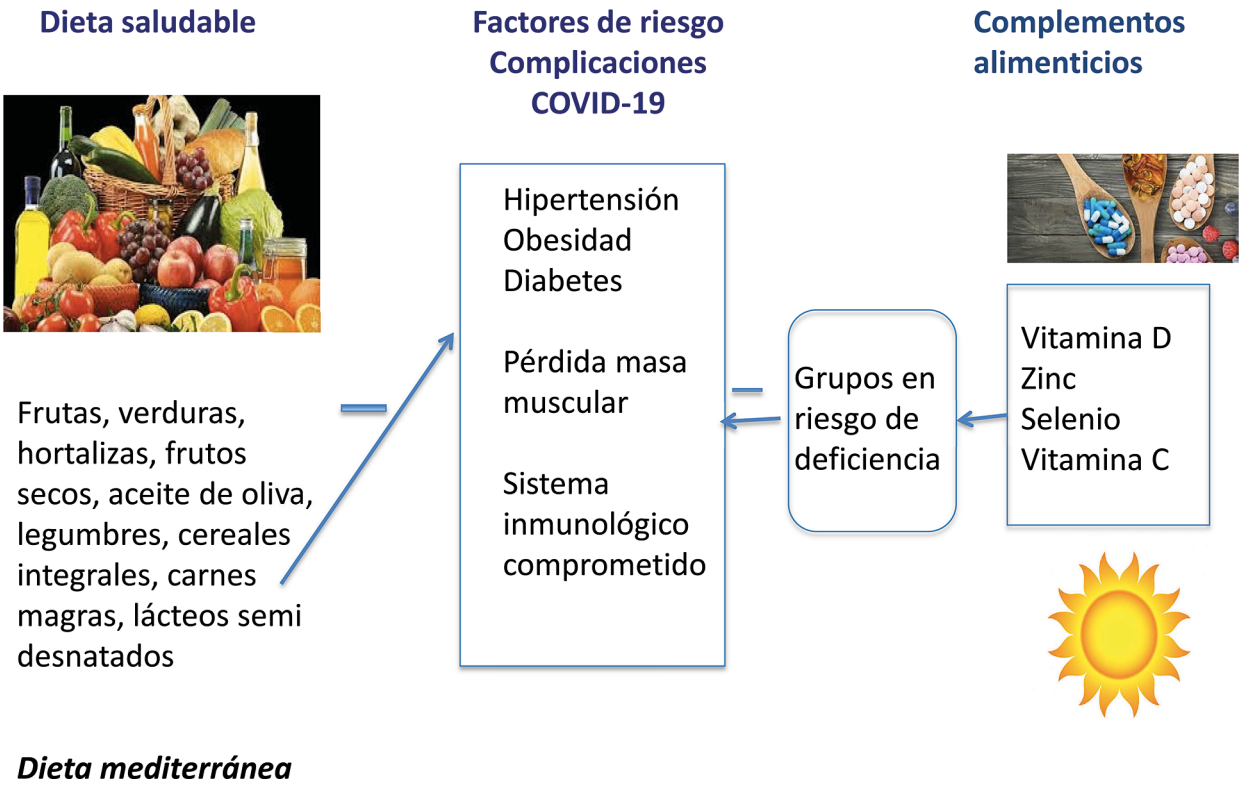


Figura 1. Factores dietéticos de interés en la prevención de COVID-19

profesionales, las sociedades y los gobiernos. Lo que sabemos que funciona para optimizar nuestra inmunidad son las recomendaciones generales de siempre: seguir una dieta variada como la mediterránea, practicar ejercicio moderado, evitar el tabaco y tener unas pautas de sueño adecuadas. La dieta mediterránea puede representar un enfoque estratégico potencial para abordar las condiciones a corto y largo plazo asociadas con la infección y la gravedad de COVID-19 y mejorar mortalidad y el bienestar general de las poblaciones afectadas. Desde el punto de vista de la salud pública, tales esfuerzos deben combinarse con programas destinados a aumentar la conciencia social sobre la obesidad y la necesidad de prevenirla, afrontando las desigualdades en salud y garantizando acceso a alimentos saludables y nutritivos (Angelidi *et al.* 2021; Bell *et al.* 2023).

Además de una alimentación saludable, la actividad física practicada de forma regular, la reducción del estrés y suficientes horas de descanso también ayudará a apoyar el funcionamiento normal del sistema inmunológico.

Aunque sea poco probable que el virus se transmita por alimentos, siempre se recomiendan buenas prácticas de seguridad alimentaria para minimizar el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos. Entre ellas lavar frutas y verduras antes del consumirlas, desinfectar superficies y objetos antes y después de utilizarlos, mantener separados alimentos crudos y cocinados para evitar la contaminación cruzada, utilizando diferentes utensilios/tablas de cortar para alimentos crudos y cocinados, cocinar y recalentar los alimentos a temperaturas adecuadas (≥72 °C durante 2 minutos) (AESAN 2022).

CONCLUSIONES

El consenso de las organizaciones de seguridad alimentaria es unánime en el sentido que, en base al conocimiento actual, los alimentos no son responsables de la transmisión del SARS-CoV-2 entre personas. La pandemia de COVID-19 se mantiene en base a la transmisión de persona a persona por vía respiratoria y no a través del comercio internacional de animales y alimentos.

En base a la alta supervivencia y resistencia del virus, todavía debe profundizarse en distintos aspectos claves como son la presencia de virus en el medio ambiente, en superficies alimentarias, en matrices alimentarias, así como en el virus como agente zoonótico para prevención de futuras pandemias.

Estas investigaciones pueden aportar más información a una hipotética transmisión del virus por medio de las superficies y embalajes de los alimentos significativa epidemiológicamente. Sin embargo, la aplicación de principios sólidos de control ambiental, higiene personal y prácticas higiénicas adecuadas de seguridad alimentaria, medidas que desde el primer momento han

sido reforzadas por las autoridades sanitarias, disminuyen esta probabilidad y son claves para la prevención.

No hay evidencia para apoyar la toma de complementos alimenticios a base de vitamina D para prevenir o tratar específicamente COVID-19, aunque la población debe continuar siguiendo las recomendaciones generales de la suplementación diaria de vitamina D para mantener la salud de huesos y músculos durante la pandemia de COVID-19.

Ningún alimento o suplemento puede proteger de contraer el coronavirus (COVID-19). Sin embargo, tener una dieta saludable es importante para apoyar nuestra función inmunológica y muchos nutrientes influyen en la capacidad del cuerpo para combatir infecciones.

ABREVIATURAS

AESAN: Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
ECDC: Centro Europeo de Control de Enfermedades.
EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
ICMFS: Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos.
OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal .
25-OH(D): 25-hidroxivitamina D.
UL: Ingesta superior tolerable para un nutriente esencial.

BIBLIOGRAFÍA

ACADEMIA ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA (2020), Recomendaciones de alimentación y nutrición para la población española ante la crisis sanitaria del COVID-19. Documento de postura de la Academia Española de Nutrición y Dietética y del Consejo General de Colegios Oficiales de Dietistas-Nutricionistas. Disponible en: https://academianutricionydietetica.org/NOTICIAS/alimentacioncoronavirus.pdf

AESAN (2022), Cocinar de forma segura. Disponible en: www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/cocinar_segura.htm

AESAN (2022), Complementos alimenticios. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/complementos_alimenticios.htm

AGUILAR-MARTÍNEZ A., BOSQUE-PROUS M., GONZÁLEZ-CASALS H., ..., PUIGCORBÉ S., ESQUIUS L. & ESPELT A. (2021), Social Inequalities in Changes in Diet in Adolescents during Confinement Due to COVID-19 in Spain: The DESKcohort Project. Nutrients 13(5): 1577.

AHMED, R., HASAN, R., SIDDIKI, A. M. A. M. Z. & ISLAM, Md. S. (2021), Host Range Projection of SARS-CoV-2: South Asia Perspective. Infection, Genetics and Evolution 87: 104670.

AL HEIALY, S., HACHIM, M. Y., SENOK, A., ..., HAMOUDI, R., ALSHEIKH-ALI, A. & HAMID, Q. (2020), Regulation of Angiotensin- Converting Enzyme 2 in Obesity: Implications for COVID-19. Frontiers in Physiology 11: 555139.

ANDERSEN, K. G., RAMBAUT, A., LIPKIN, W. I., HOLMES, E. C. & GARRY, R. F. (2020), The Proximal Origin of SARS-CoV-2. Nature Medicine 26(4): 450-452.

ANGELIDI, A. M., BELANGER, M. J. & MANTZOROS, C. S. (2020), COVID-19 and Diabetes Mellitus: What We Know, How Our Patients Should Be Treated Now, and What Should Happen Next. Metabolism 107: 154245.

ANGELIDI, A.M., KOKKINOS, A., KATECHAKI, E., ROS, E. & MANTZOROS, C.S. (2021), Mediterranean Diet as a Nutritional Approach for COVID-19. Metabolism, 114, 154407.

ANSES (2020), French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, 20 March 20, Disponible en: https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2020SA0037-1EN.pdf

ANNWEILER, G., CORVAISIER, M., GAUTIER, J., DUBÉE, V., LEGRAND, E., SACCO, G. & ANNWEILER, C. (2020), Vitamin D Supplementation Associated to Better Survival in Hospitalized Frail Elderly COVID-19 Patients: The GERIA-COVID Quasi-Experimental Study. Nutrients 12(11): 3377.

AUERSWALD, H., YANN, S., DUL, S., IN, S., DUSSART, P., MARTIN, N. J., KARLSSON, E. A. & GARCIA-RIVERA, J. A. (2021), Assessment of Inactivation Procedures for SARS-CoV-2. Journal of General Virology 102(3): 001539.

AZHAR, E. I., HUI, D. S. C., MEMISH, Z. A., DROSTEN, C. & ZUMLA, A. (2019), The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). Infectious Disease Clinics of North America 33(4): 891-905.

BAILEY, E. S., CURCIC, M. & SOBSEY, M. D. (2022), Persistence of Coronavirus Surrogates on Meat and Fish Products during Long-Term Storage. Applied Environmental Microbiology 88 (12): e50422.

BAKER, C.A. & GIBSON, K.E. (2022), Persistence of SARS-CoV-2 on Surfaces and Relevance to the Food Industry. Current Opinion in Food Science 47: 100875.

BARH, D., ANDRADE, B.S., TIWARI, S., ..., ALCANTARA, L.C., AZEVEDO, V. & GHOSH, P. (2020), Natural Selection versus Creation: A Literature Review on the Origin of SARS-CoV-2. Le Infezioni in Medicina 3: 302-313.

BAUD, D., DIMOPOULOU, A.V., GIBSON GLENN, R., REID, G. & GIANNONI, E. (2020), Using Probiotics to Flatten the Curve of Coronavirus Disease COVID-2019 Pandemic. Frontiers in Public Health 8: 186.

BELL, M.G., GANESH, R. & BONNES, S.L. (2023), COVID-19, the Gut, and Nutritional Implications. Current Nutrition Reports 12: 263-269.

BfR (2021), Bundesinstitut für Riskobewertung. Vitamin D, the Immune System and COVID-19. BfR Communication No. 015/2021 of 14 May. Disponible en: https://www.bfr.bund.de/cm/349/vitamin-d-the-immune-system-and-covid-19.pdf

BONI, M. F., LEMEY, P., JIANG, X., ..., CASTOE, T., RAMBAUT, A. & ROBERTSON, D. L. (2020), Evolutionary Origins of the SARS-CoV-2 Sarbecovirus Lineage Responsible for the COVID-19 Pandemic. Nature Microbiology 5: 1408-1417.

BOUILLON, R., MARCOCCI, C., CARMELIET, G., ..., LAZARETTI-CASTRO, M., GIUSTINA, A. & BILEZIKIAN, J. (2018), Skeletal and Extraskeletal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. Endocrine Reviews 40(4): 1109-1151.

BUTLER, M. J. & BARRIENTOS, R. M. (2020), The Impact of Nutrition on COVID-19 Susceptibility and Long-Term Consequences. Brain, Behavior and Immunity 87: 53-54.

CALDER, P.C., CARR, A.C., GOMBART, A.F. & EGGERSDORFER, M. (2020), Optimal Nutritional Status for a Well-Functioning Immune System Is an Important Factor to Protect against Viral Infections. Nutrients 12(4): 1181.

CÁMARA-HURTADO, M. M. (2021), Alimentación saludable y sostenible en tiempos de la pandemia COVID-19. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia 87(2): 195-204.

CASHMAN, K. D., DOWLING, K. G., ŠKRABÁKOVÁ, Z., ..., G. B., RABENBERG, M., BUSCH, M. A. & COX, L. (2016), Vitamin D Deficiency in Europe: Pandemic? The American Journal of Clinical Nutrition 103(4): 1033-1044.

CHEUNG, K. S., HUNG, I. FN., CHAN, P. PY., ..., TO, K. KW., CHAN, KWOK-H. & YUEN, KWOK-Y. (2020), Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples from the Hong Kong Cohort and Systematic Review and Meta-Analysis. Gastroenterology 159(1): 81-95.

CHIODINI, I., GATTI, D., SORANNA, D., ..., PERSANI, L., ZAMBON, A. & GENNARI, L. (2021), Vitamin D Status and SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Clinical Outcomes. Frontiers in Public Health 9: 736665.

CHI, Y., WANG, Q., CHEN, G. & ZHENG, S. (2021), The Long-Term Presence of SARS-CoV-2 on Cold-Chain Food Packaging Surfaces Indicates a New COVID-19 Winter Outbreak: A Mini Review. Frontiers in Public Health 9: 650493.

D'AVOLIO, A., AVATANEO, V., MANCA, A., ..., LUCCHINI, R., KELLER, F. & CANTÙ, M. (2020), 25-Hydroxyvitamin D Concentrations Are Lower in Patients with Positive PCR for SARS-CoV-2. Nutrients 12(5): 1359.

DARNELL, M. E. R., SUBBARAO, K., FEINSTONE, S. M. & TAYLOR, D. R. (2004), Inactivation of the Coronavirus that Induces Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS-CoV-2. Journal of Virological Methods 121(1): 85-91.

DEHBANDI, R. & ZAZOULI, M. A. (2020), Stability of SARS-CoV-2 in Different Environmental Conditions. The Lancet Microbe 1(4): e145.

DE FARIA COELHO-RAVAGNANI, C., CORGOSINHO, F.C., SANCHES, F.F.Z., PRADO, C.M.M., LAVIANO, A. & MOTA, J.F. (2021), Dietary Recommendations during the COVID-19. Nutrition Reviews 79 (4): 382-393.

DO VALE, B., LOPES, A. P., FONTES, M. DA C., SILVESTRE, M., CARDOSO, L. & COELHO, A. C. (2021), Bats, Pangolins, Minks and Other Animals–Villains or Victims of SARS-CoV-2? Veterinary Research Communications 45(1): 1-19.

DOMINGO, J. L. (2021), What We Know and What We Need to Know about the Origin of SARS-CoV-2. Environmental Research 200: 111785.

DUDA-CHODAK, A., LUKASIEWICZ, M., ZIĘĆ, G., FLORKIEWICZ, A. & FILIPIAK-FLORKIEWICZ, A. (2020), COVID-19 Pandemic and Food: Present Knowledge, Risks, Consumers Fears and Safety. Trends in Food Science & Technology 105: 145-160.

FRAZZINI, S., AMADORI, M., TURIN, L. & RIVA, F. (2022), SARS CoV-2 Infections in Animals, Two Years into the Pandemic. Archives of Virology 167: 2503-2517.

HOLMES, E. C., GOLDSTEIN, S. A., RASMUSSEN, ..., ANDERSEN, K. G., GARRY, R.F. & RAMBAUT, A. (2021), The Origins of SARS-CoV-2: A Critical Review. Cell 184(19): 4848-4856.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2010), Scientific Opinion on the Substantiation of Health Claims Related to Vitamin D and Normal Function of the Immune System and Inflammatory Response (ID 154, 159), Maintenance of Normal Muscle Function (ID 155) and Maintenance of Normal Cardiovascular Function (ID 159) Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No1924/2006.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2012), Scientific Opinion on the Tolerable upper Intake Level of Vitamin D. EFSA Journal 10(7): 2813.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) (2016), Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Vitamin D. EFSA Journal 14(10): 4547 (145 pp).

EC (EUROPEAN COMMISSION) (2021), EU Register of Health Claims. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=register.home

ENTRENAS CASTILLO, M., ENTRENAS COSTA, L. M., VAQUERO BARRIOS, J. M., ..., LÓPEZ MIRANDA, J., BOUILLON, R. & QUESADA GOMEZ, J. M. (2020), Effect of Calcifediol Treatment and Best Available Therapy versus Best Available Therapy on Intensive Care Unit Admission and Mortality among Patients Hospitalized for COVID-19: A Pilot Randomized Clinical Study. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 203: 105751.

EUFIC (2020), European Food Information Council. Los alimentos y el coronavirus (COVID-19): lo que debes saber. Disponible en: https://www.eufic.org/es/seguridad-alimentaria/articulo/los-alimentos-y-el-coronavirus-covid-19-lo-que-debes-saber/

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2020), Detection of New SARS-CoV-2 Variants Related to Mink – 12 November. ECDC: Stockholm; Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/RRA-SARS-CoV-2-in-mink-12-nov-2020.pdf

BOKLUND, A., GORTÁZAR, C., PASQUALI, P., ..., ADLHOCH, C., ALM, E., MELIDOU, A. & MIRINA-VICIUTE, G. (2021), Monitoring of SARS-CoV-2 Infection in Mustelids. EFSA Journal 19(3): e06459.

FAO (2020), COVID-19 e inocuidad de los alimentos: orientaciones para las empresas alimentarias, 7 abril. Disponible en: https://www.fao.org/publications/card/es/c/CA8660ES/

FAO (2021), COVID-19: Guidance for Preventing Transmission of COVID-19 within Food Businesses Updated Guidance, 2 August; https://www.fao.org/documents/card/es/c/cb6030en/

FAO (2020), Exposure of Humans or Animals to Sars-cov-2 from Wild, Livestock, Companion and Aquatic Animals, 2020; https://www.fao.org/documents/card/es/c/ca9959en/

FAO (2020), La inocuidad de los alimentos en tiempos de COVID, 14 abril 2020. Disponible en: https://www.fao.org/publications/card/es/c/CA8623ES/

FISHER, D., REILLY, A., KANG ENG ZHENG, A., COOK, A. & ANDERSON, D. (2020), Seeding of Outbreaks of COVID-19 by Contaminated Fresh and Frozen Food. https://doi.org/10.1101/2020.08.17.255166

GALMES, S., SERRA, F. & PALOU, A. (2020), Current State of Evidence: Influence of Nutritional and Nutrigenetic Factors on Immunity in the COVID-19 Pandemic Framework. Nutrients 12(9): 2738.

GASMI, A., TIPPAIROTE, T., MUJAWDIYA, P. K., ..., A., DADAR, M., GASMI BENAHMED, A. & BJØRKLUND, G. (2020), Micronutrients as Immunomodulatory Tools for COVID-19 Management. Clinical Immunology 220: 108545.

GAWLIK, B., TAVAZZI, S., MARIANI, G., ..., HIGGINS, T., MEDEMA, G. & WINTGENS, T. (2021), SARS-CoV-2 Surveillance Employing Sewage – Towards a Sentinel System, EUR 30684 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-76-36887-8.

GIACOBBO, A., RODRIGUES, M. A. S., ZOPPAS FERREIRA, J., BERNARDES, A. M. & DE PINHO, M. N. (2021), A Critical Review on SARS-CoV-2 Infectivity in Water and Wastewater. What Do We Know? Science of the Total Environment 774: 145721.

GIBSON-MOORE, H. (2021), Vitamin D: What's New a Year on from the COVID-19 Outbreak? Nutrition Bulletin 46(2): 195-205.

GIDARI, A., SABBATINI, S., BASTIANELLI, S., ..., RENDE, M., CRUCIANI, G. & FRANCISCI, D. (2021), SARS-CoV-2 Survival on Surfaces and the Effect of UV-C Light. Viruses 13(3): 408.

GIOBBE, G. G., BONFANTE, F., JONES, B. C., ..., PANZARIN, V., THAPAR, N. & LI, V. S. W. (2021), SARS-CoV-2 Infection and Replication in Human Gastric Organoids. Nature Communications 12: 6610.

GODOY, M. G., KIBENGE, M. J. T. & KIBENGE, F. S. B. (2021), SARS-CoV-2 Transmission Via Aquatic Food Animal Species or Their Products: A Review. Aquaculture 536: 736460.

GORTÁZAR, C., BARROSO-ARÉVALO, S., FERRERAS-COLINO, E., ..., DOMÍNGUEZ, L., FUENTE, J. DE LA & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J. M. (2021), Natural SARS-CoV-2 Infection in Kept Ferrets, Spain. Emerging Infectious Diseases 27(7): 1994-1996.

GUO, M., TAO, W., FLAVELL, R. A. & ZHU, S. (2021), Potential Intestinal Infection and Faecal-Oral Transmission of SARS-CoV-2. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 18(4): 269-283.

HASÖKSÜZ, M., KILIÇ, S. & SARAÇ, F. (2020), Coronaviruses and SARS-CoV-2. Turkish Journal of Medical Sciences 50(SI-1): 549-556.

HELMY, Y. A., FAWZY, M., ELASWAD, A., SOBIEH, A., KENNEY, S. P. & SHEHATA, A. A. (2020), The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. Journal of Clinical Medicine 9(4): 1225.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., ..., SALMINEN, S., CALDER, P. C. & SANDERS, M. E. (2014), Expert Consensus Document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology 11(8): 506-514.

ICMSF Opinion on SARS-CoV-2 and Its Relationship to Food Safety, 3 September 2020. Disponible en: https://www.icmsf.org/wp-content/uploads/2020/09/ICMSF2020-Letterhead-COVID-19-opinion-final-03-Sept-2020.BF_.pdf

JOLLIFFE, D. A., HOLT, H., GREENIG, M., TALAEI, M., PERDEK, N., PFEFFER, P. *et al.* (2022), Effect of a Test-and-Treat Approach to Vitamin D Supplementation on Risk of All Cause Acute Respiratory Tract Infection and COVID-19: Phase 3 Randomised Controlled Trial (CORONAVIT). *BMJ* 378: e071230.

JUNG, S., YEO, D., WANG, Z. & CHOI, C. (2024), Survival of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Foods and Its Inactivation by Different Methods. Current Opinion in Food Science 55: 101116.

KAMPF, G., TODT, D., PFAENDER, S. & STEINMANN, E. (2020), Persistence of Coronaviruses on Inanimate Surfaces and Their Inactivation with Biocidal Agents. Journal of Hospital Infection 104(3): 243-251.

KASLOFF, S. B., LEUNG, A., STRONG, J. E., FUNK, D. & CUTTS, T. (2021), Stability of SARS-CoV-2 on Critical Personal Protective Equipment. Scientific Reports 11(1): 984.

KIM, Y.-I., KIM, S.-G., KIM, S.-M., KIM, E.-H., ..., CHUNG, K.-H., FOO, S.-S. & POO, H. (2020), Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets. Cell Host & Microbe 27(5): 704-709.

KU KUMAR, R., RATHI, H., HAQ, A., WIMALAWANSA, S.J. & SHARMA, A. (2021), Putative Roles of Vitamin D in Modulating Immune Response and Immunopathology Associated with COVID-19. Virus Research 292: 198235.

LAMERS, M. M., BEUMER, J., VAART, J. VAN DER, ..., CUPPEN, E., PETERS, P. J. & HAAGMANS, B. L. (2020), SARS-CoV-2 Productively Infects Human Gut Enterocytes. Science 369(6499): 50-54.

LIPS, P., CASHMAN, K. D., LAMBERG-ALLARDT, C., ..., STEPAN, J., EL-HAJJ FULEIHAN, G. & BOUILLON, R. (2019), Current Vitamin D Status in European and Middle East Countries and Strategies to Prevent Vitamin D Deficiency: A Position Statement of the European Calcified Tissue Society. European Journal of Endocrinology 180(4): P23-P54.

LOCKYER, S. (2020), Effects of Diets, Foods and Nutrients on Immunity: Implications for COVID-19. Nutrition Bulletin 45 (4): 456-473.

LÓPEZ-MORENO, M., LÓPEZ, M. T. I., MIGUEL, M. & GARCÉS-RIMÓN, M. (2020), Physical and Psychological Effects Related to Food Habits and Lifestyle Changes Derived from COVID-19 Home Confinement in the Spanish population. Nutrients 12(11): 3445.

LOUCA, P., MURRAY, B., KLASER, K. *et al.* (2021), Modest Effects of Dietary Supplements during the COVID-19 Pandemic: Insights from 445 850 Users of the COVID-19 Symptom Study App. BMJ Nutrition, Prevention & Health 4: e000250.

LU, L.-C., QUINTELA, I., LIN, C.-H., LIN, T.-C., LIN, C.-H., WU, V. C. H. & LIN, C.-S. (2021), A Review of Epidemic Investigation on Cold-Chain Food-Mediated SARS-CoV-2 Transmission and Food Safety Consideration during COVID-19 Pandemic. Journal of Food Safety 41(6): e12932.

MICHALAKIS, K., PANAGIOTOU, G., ILIAS, I., PAZAITOU-PANAYIOTOU, K. (2021), Obesity and COVID-19: A Jigsaw Puzzle with Still Missing Pieces. Clinical Obesity 11: e12420.

MIGNOGNA, C., COSTANZO, S., GHULAM, A., ..., DE GAETANO, G., IACOVIELLO, L. & BONACCIO, M. (2021), Impact of Nationwide Lockdowns Resulting from the First Wave of the COVID-19 Pandemic on Food Intake, Eating Behaviors, and Diet Quality: A Systematic Review. Advances in Nutrition 13(2): 388-423.

MIRASHRAFI, S., MORAVEJOLAHKAMI, A.R., BALOUCH ZEHI, Z., ..., HARATIAN, M., GANJALI DASHTI, M. & POURHOSSEIN, M. (2021), The Efficacy of Probiotics on Virus Titres and Antibody Production in Virus Diseases: A Systematic Review on Recent Evidence for COVID-19 Treatment. Clinical Nutrition ESPEN 46: 1-8.

MONLEZUN, D.J., BITTNER, E.A., CHRISTOPHER, K.B., CAMARGO, C.A. & QURAISHI, S.A. (2015), Vitamin D Status and Acute Respiratory Infection: Cross Sectional Results from the United States National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2006. Nutrients 7: 1933-1944.

MOSSINK, J.P. (2020), Zinc as Nutritional Intervention and Prevention Measure for COVID-19 Disease. BMJ Nutrition, Prevention & Health 3: e000095.

MUNNINK, B. B. O., SIKKEMA, R. S., NIEUWENHUIJSE, D. F., ..., A. A. VAN DER, VELKERS, F. C., SMIT, L. A. M. & STEGEMAN, A. (2020), Transmission of SARS-CoV-2 on Mink Farms between Humans and Mink and Back to Humans. Science 371(6525): 172-177.

MURAI, I.H., FERNANDES, A.L., SALES, L.P., ..., CAPARBO, V. F., GUALANO, B. & PEREIRA, R. M. R. (2021), Effect of a Single High Dose of Vitamin D3 on Hospital Length of Stay in Patients with Moderate to Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial. JAMA (11): 1053-1060.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (EEUU) (2023), COVID-19 Treatment Guidelines, Vitamin D. Disponible en: https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/supplements/vitamin-d/

NHS (National Health System, UK) (2020), Do I Need Vitamin Supplements? Disponible en: https://www.nhs.uk/common-health-questions/food-and-diet/do-ineed-vitamin-supplements/

O'BRIEN, B., GOODRIDGE, L., RONHOLM, J. & NASHERI, N. (2021), Exploring the Potential of Foodborne Transmission of Respiratory Viruses. Food Microbiology 95: 103709.

OIE (2023), SARS-CoV-2 In Animals Situation Report 22. Disponible en: https://www.woah.org/app/uploads/2023/07/sars-cov-2-situation-report-22.pdf

OIE (2021), SARS-CoV-2 In Animals Situation Report, March. Disponible en: https://www.oie.int/app/uploads/2021/11/sars-cov-2-situation-report-6.pdf

OIE (2020), Considerations for Sampling, Testing, and Reporting of SARS-CoV-2 in Animals, Julio. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/MM/A_Sampling_Testing_and_Reporting_of_SARS-CoV-2_in_animals_3_July_2020.pdf

OMS-Europa (2020), Food and Nutrition Tips during Self-Quarantine. Disponible en: https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/publications-and-technical-guidance/noncommunicable-diseases/food-and-nutrition-tips-during-self-quarantine

OMS (2020), Healthy Diet Fact Sheet. World Health Organization. Nutrition Advice for Adults during the COVID-19 Outbreak. Disponible en: http://www.emro.who.int/nutrition/nutrition-infocus/nutrition-advice-foradults-during-the-covid-19-outbreak.html

OMS (2020), Las 10 principales causas de defunción. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death

PÉREZ CASTRILLÓN, J.L., CASADO, E., CORRAL GUDINO, L., GÓMEZ ALONSO, C., PERIS, P. & RIANCHO, J.A. (2020), COVID-19 y vitamina D. Documento de posición de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM). Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral 12(4): 155-159.

OTTER, J.A., DONSKEY, C., YEZLI, S., DOUTHWAITE, S., GOLDENBERG, S.D. & WEBER, D. J. (2016), Transmission of SARS and MERS Coronaviruses and Influenza Virus in Healthcare Settings: The Possible Role of Dry Surface Contamination. Journal of Hospital Infection 92: 235-250.

PASTORINO, B., TOURET, F., GILLES, M., LAMBALLERIE DE, X. & CHARREL, R.N. (2020), Evaluation of Heating and Chemical Protocols for Inactivating SARSCoV-2. Viruses 12: 624.

PEDERSEN, R. M., TORNBY, D. S., BANG, L. L., MADSEN, L. W., SKOV, M. N., JENSEN, T. G., JOHANSEN, I. S. & ANDERSEN, T. E. (2021), Rectally shed SARS-CoV-2 Lacks Infectivity: Time to Rethink Faecal–Oral Transmission? Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 18(9): 669.

PÉREZ-RODRIGO, C., GIANZO CITORES, M., HERVÁS BÁRBARA G., RUIZ LITAGO, F., CASIS SÁENZ, L. & ARANCETA-BARTRINA, J. (2020), Cambios en los hábitos alimentarios durante el período de confinamiento por la pandemia COVID-19 en España. Revista Española de Nutrición Comunitaria 26(2): 101-111.

PETROVA, D., SALAMANCA-FERNÁNDEZ, E., RODRÍGUEZ BARRANCO, M., NAVARRO PÉREZ, P., JIMÉNEZ MOLEÓN, J.J. & SÁNCHEZ, M.J. (2020), La obesidad como factor de riesgo en personas con COVID-19: posibles mecanismos e implicaciones. Atención Primaria 52 (7): 496-500.

QIAN, Q., FAN, L., LIU, W., LI, J., YUE, J., WANG, M., KE, X., YIN, Y., CHEN, Q. & JIANG, C. (2021), Direct Evidence of Active SARS-CoV-2 Replication in the Intestine. Clinical Infectious Diseases 73 (3): 361-366.

RICHARD, M., KOK, A., DE MEULDER, D. *et al.* (2020), SARS-CoV-2 Is Transmitted via Contact and via the Air between Ferrets. Nature Communications 11: 3496.

RIDDELL, S., GOLDIE, S., HILL, A., EAGLES, D. & DREWET, T.W. (2020), The Effect of Temperature on Persistence of SARS-CoV-2 on Common Surfaces. Virology Journal 17: 145.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, C., MOLINA-MONTES, E., VERARDO, V., ..., GARCÍA VILLANOVA, B., GUERRA-HERNÁNDEZ, E.J. & RUIZ-LÓPEZ, M.D. (2020), Changes in Dietary Behaviours during the COVID-19 Outbreak Confinement in the Spanish COVIDiet Study. Nutrients 12(6): 1-19.

ROMEO-ARROYO, E., MORA, M. & VÁZQUEZ-ARAÚJO, L. (2020), Consumer Behavior in Confinement Times: Food Choice and Cooking Attitudes in Spain. International Journal of Gastronomy and Food Science 21: 100226.

PEDERSEN, R. M., TORNBY, D. S., BANG, L. L., ..., JENSEN, T. G., JOHANSEN, I. S. & ANDERSEN, T. E. (2022), Rectally Shed SARS-CoV-2 in COVID-19 Inpatients Is Consistently Lower than Respiratory Shedding and Lacks Infectivity. Clinical Microbiology and Infection 28(2): 304.e1-304.e3.

SACN (2020), Scientific Advisory Committee on Nutrition, UK, Rapid review: Vitamin D and Acute Respiratory Tract Infections. Disponible en: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/944108/SACN_June2020_VitaminD_AcuteRespiratoryTractInfections.pdf

SALA-COMORERA, L., REYNOLDS, L.J., MARTIN, N.A., O'SULLIVAN, J.J., MEIJER, W.G. & FLETCHER, N.F. (2021), Decay of Infectious SARS-CoV-2 and Surrogates in Aquatic Environments. Water Research 201: 117090.

SÁNCHEZ, E., LECUBE, A., BELLIDO, D., MONEREO, S., MALAGÓN, M.M. & TINAHONES, F.J. (2021), Leading Factors for Weight Gain during COVID-19 Lockdown in a Spanish Population: A Cross-Sectional Study. Nutrients 13(3): 1-12.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, E., RAMÍREZ-VARGAS, G., AVELLANEDA-LÓPEZ, Y., ORELLANA PECINO, J.I., GARCÍA-MARÍN, E. & DÍAZ-JIMENEZ, J. (2020), Eating Habits and Physical Activity of the Spanish Population during the Covid-19 Pandemic Period. Nutrients 12(9): 2826.

SANTOS, H.O., TEIXEIRA, F.J. & SCHOENFELD, B.J. (2020), Dietary vs. Pharmacological Doses of Zinc: A Clinical Review. Clinical Nutrition 39: 1345-1353.

SANGKHAM, S. (2021), A Review on Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater in Light of the Current Knowledge of Treatment Process for Removal of Viral Fragments. Journal of Environmental Management 299: 113563.

SATTAR, N., McINNES, I.B. & McMURRAY, J.J.V. (2020), Obesity Is a Risk Factor for Severe COVID-19 Infection: Multiple Potential Mechanisms. Circulation 142: 4-6.

SHI, J., WEN, Z., ZHONG, G., YANG, H., WANG, C., HUANG, B... *et al.* (2020), Susceptibility of Ferrets, Cats, Dogs, and Other Domesticated Animals to SARS-Coronavirus 2. Science 368: 1016-1020.

SKALNY, A.V., RINK, L., AJSUVAKOVA, O.P., ASCHNER, M., GRITSENKO, V.A., ALEKSEENKO, S.I. *et al.* (2020), Zinc and Respiratory Tract Infections: Perspectives for COVID-19. International Journal of Molecular Medicine 46(1): 17e26.

TERMANSEN, M.B. & FRISCHE, S. (2023), Fecal-Oral Transmission of SARS-CoV-2: A Systematic Review of Evidence from Epidemiological and Experimental Studies (2023) American Journal of Infection Control 51 (12): 1430-1437.

URSACHI, C.S., MUNTEANU, F. & CIOCA, G. (2021), The Safety of Slaughterhouse Workers during the Pandemic Crisis. International Journal of Environmental Research and Public Health 18(5): 2633.

VAN DOREMALEN, N., BUSHMAKER, T., MORRIS, D. H., ..., LLOYD-SMITH, J.O., DE WIT, E., MUNSTER, V. J. (2020), Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. The New England Journal of Medicine 382(16): 1564-1567.

VOGEL-GONZÁLEZ, M., TALLÓ-PARRA, M., HERRERA-FERNÁNDEZ, V., PÉREZ-VILARÓ, G., CHILLÓN M., NOGUÉS, X. *et al.* (2021), Low Zinc Levels at Admission Associates with Poor Clinical Outcomes in SARS-CoV-2 Infection. Nutrients 13(2): 562.

WÖLFEL, R., CORMAN, V.M., GUGGEMOS, W., SEILMAIER, M., ZANGE, S., MÜLLER, M.A., JONES, T.C. *et al.* (2020), Virological Assessment of Hospitalized Patients with COVID-2019. Nature 581: 465-469.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2020), Transmission of SARS-CoV-2: Implications for Infection Prevention Precautions: Scientific Brief, 09 July 2020. World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/333114

XAVIER-SANTOS, D., PADILHA, M., ALEXANDRE FABIANO, G., VINDEROLA, G., GOMES CRUZ, A., SIVIERI, A. & COSTA ANTUNES, A.E. (2022), Evidences and Perspectives of the use of Probiotics, Prebiotics, Symbiotic, and Postbiotics as Adjuvants for Prevention and Treatment of COVID-19: A Bibliometric Analysis and Systematic Review. Trends in Food Science & Technology 120: 174-192.

XIAO, F. *et al.* (2020), Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19. Emerging Infectious Diseases 26: 1920-1922.

XU, J., YANG, J., CHEN, J., LUO, Q., ZHANG, Q., ZHANG, H. (2017), Vitamin D Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Via Regulation of the Renin-Angiotensin System. Molecular Medicine Reports 16: 7432-7438.

ZANG, R. *et al.* (2020), TMPRSS2 and TMPRSS4 Promote SARS-CoV-2 Infection of Human Small Intestinal Enterocytes. Science Immunology 5: eabc3582.

ZHANG, T., WU, Q. & ZHANG, Z. (2020), Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. Current Biology 30 (7): 1346-1351.

ZHANG, Y. Z. & HOLMES, E. C. (2020), A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. Cell 181(2). 223-227.

Capítulo X
El impacto económico de la pandemia

Francisco Ferraro
Catedrático jubilado de Economía Aplicada de la Universidad de Sevilla
Miembro del Observatorio Económico de Andalucía

Por su carácter global y por su profundidad, la pandemia de COVID-19 ha provocado la mayor crisis económica de los tiempos modernos. Si bien la crisis no es de larga duración, ha generado múltiples impactos sociales y cambios en el consumo y en la producción. En este capítulo se abordarán la evolución, la entidad y los efectos económicos y sociales más relevantes de la crisis económica en el mundo y en España, y se apuntan las previsibles tendencias incentivadas por la pandemia.

1. La crisis económica en el mundo

Las primeras medidas restrictivas a la actividad económica y a la movilidad personal que se adoptaron en China provocaron una reducción de la actividad económica en múltiples sectores de este país, singularmente en industrias exportadoras que surtían de bienes de consumo, de componentes tecnológicos y otros productos industriales a buena parte del mundo, provocando la ruptura de cadenas globales de suministros. Esta caída de las exportaciones produjo un shock de oferta que incidió en la economía mundial elevando precios y frenando o impidiendo la actividad de muchas industrias. Posteriormente, la extensión de la pandemia, primero a Italia y después a otros países europeos, obligó a los gobiernos a adoptar medidas restrictivas a la actividad y a la movilidad desde el mes de marzo, provocando un shock de demanda de mayor intensidad que el de oferta, con una fuerte contracción del consumo y aún mayor de la inversión. Esta dinámica se fue extendiendo por el resto del mundo, de forma que desde marzo hasta mayo se produjo la contracción de la economía mundial más profunda y generalizada desde que se dispone de información estadística de los principales agregados económicos. Una contracción sincronizada de la producción, el consumo, la inversión y el comercio internacional en la práctica totalidad de los países del mundo, que llevó aparejado un impacto catastrófico en el mercado laboral, con una disminución de las horas trabajadas del 4,5 %, más intensa en los niveles bajos y medios bajo de ingresos según la Organización Mundial del Trabajo.

En China, después del levantamiento parcial del confinamiento a comienzos de abril, y con el estímulo de la inversión pública, se produjo una recuperación de la actividad económica en el segundo trimestre y, a partir de mayo, algunos países comenzaron a reabrir actividades tras el Gran Confinamiento, aunque otros las reducían debido a la propagación de la pandemia.

El segundo semestre se inició con el aplanamiento de la curva de contagios en muchos países desarrollados, lo que permitió impulsar la actividad, pero pronto se registró un aumento de contagios en países en los que se había reducido la tasa de infección (España, Francia, Japón, Australia), lo que obligó a nuevas restricciones que ralentizaron la recuperación. Hasta final de año fueron alternándose recuperaciones y nuevas olas de contagios y, aunque la adaptación de las empresas a la pandemia permitió aumentar la producción, no se alcanzó a compensar la contracción del primer semestre, por lo que el balance anual de la economía mundial fue una reducción del Producto Interior Bruto (PIB) del -3,1 %. La contracción fue generalizada en la mayor parte de los países del mundo y con mayor intensidad en las economías desarrolladas, especialmente en países europeos como

Tabla 1. Evolución de la economía mundial (% de variación interanual)

	Estimación			Proyección	
	2019	2020	2021	2022	2023
Mundo	2,8	-3,1	5,9	4,4	3,8
Economías avanzadas	1,6	-4,5	5,0	3,9	2,6
Estados Unidos	2,2	-3,4	5,6	4,0	2,6
Eurozona	1,3	-6,4	5,2	3,9	2,5
Alemania	0,6	-4,6	2,7	3,8	2,5
Francia	1,8	-8,0	6,7	3,5	1,8
Italia	0,3	-8,9	6,2	3,8	2,2
España	2,0	-10,8	4,9	5,8	3,8
Japón	0,0	-4,5	1,6	3,3	1,8
Reino Unido	1,4	-9,4	7,2	4,7	2,3
Canadá	1,9	-5,2	4,7	4,1	2,8
Otras economías avanzadas	1,9	-1,9	4,7	3,6	2,9
Economías de mercados emergentes y en desarrollo	3,7	-2,0	6,5	4,8	4,7
Economías emergentes y en desarrollo de Asia	5,4	-0,9	7,2	5,9	5,8
China	6,0	2,3	8,1	4,8	5,2
India	4,0	-7,3	9,0	9,0	7,1
ASEAN*	4,9	-3,4	3,1	5,6	6,0
Economías emergentes y en desarrollo de Europa	2,5	-1,8	6,5	3,5	2,9
Rusia	2,0	-2,7	4,5	2,8	2,1
América Latina y el Caribe	0,1	-6,9	6,8	2,4	2,6
Brasil	1,4	-3,9	4,7	0,3	1,6
México	-0,2	-8,2	5,3	2,8	2,7
Oriente Medio y Asia Central	1,4	-2,8	4,2	4,3	3,6
Arabia Saudita	0,3	-4,1	2,9	4,8	2,8
África subsahariana	3,2	-1,7	4,0	3,7	4,0
Nigeria	2,2	-1,8	3,0	2,7	2,7
Sudáfrica	0,2	-6,4	4,6	1,9	1,4
Unión Europea	1,8	-5,9	5,2	4,0	2,8
Oriente Medio y Norte de África	0,8	-3,2	4,1	4,4	3,4
Economías de mercados emergentes e ingreso mediano	3,5	-2,2	6,8	4,8	4,6
Países en desarrollo de bajo ingreso	5,3	0,1	3,1	5,3	5,5
Volumen del comercio mundial	0,9	-8,2	9,3	6,0	4,9
Economías avanzadas	1,4	-9,0	8,3	6,2	4,6
Economías de mercados emergentes y en desarrollo	-0,2	-6,7	11,1	5,7	5,4
Precios al consumo					
Economías avanzadas	1,4	0,7	3,1	3,9	2,1
Economías de mercados emergentes y en desarrollo	5,1	5,1	5,7	5,9	4,7
Precios del petróleo	-10,2	-32,7	67,3	11,9	-7,8

Fuente: Fondo Monetario Internacional (FMI)
* Filipinas, Indonesia, Malasia, Tailandia, Vietnam

España (-10,8 %) y Reino Unido (-9,4 %), siendo más reducida la contracción de Estados Unidos (-3,4 %) y Japón (-4,5 %). Entre las excepciones, la más destacada fue China, que creció el 2,3 %. Los países emergentes y en desarrollo sufrieron la pandemia con menor intensidad (especialmente los de menores ingresos, cuyo balance agregado no fue negativo), aunque de forma muy desigual, pues mientras algunos países con monocultivo del turismo o con tensiones bélicas sufrieron reducciones del PIB superiores al 10 % (Bahamas, Cuba, Irak, Libia, Líbano, Macao, Barbados), otros mantuvieron crecimientos positivos (Egipto, Etiopía, Guinea, Irán, Senegal, Somalia, Tanzania, Vietnam).

El comportamiento económico de 2021 fue desigual por áreas y a lo largo del año. Mientras que en los países desarrollados comenzó con un aumento notable de los contagios y fallecimientos, los indicadores económicos del primer trimestre sorprendieron al alza, especialmente en Asia y América Latina. Desde la primavera el éxito de las vacunas y las políticas de apoyo propiciaron la normalización de la actividad económica también en los países desarrollados.

No obstante, aunque la producción se fue recuperando, en el tercer trimestre del año empezaron a hacerse notables los desajustes entre la oferta y la demanda, derivados de una parte del shock de oferta inicial causado por la pandemia, con restricciones en las cadenas globales de suministro, a lo que se fueron sumando los efectos de los cambios en los patrones de gasto derivados del confinamiento y el teletrabajo, que provocaron un aumento del gasto en bienes de consumo doméstico (en detrimento de algunos servicios), singularmente de electrónica para el trabajo y entretenimiento. Estos cambios, junto a las mencionadas restricciones de oferta y las limitaciones en el transporte marítimo determinaron la escasez de componentes electrónicos en múltiples sectores, singularmente el automotriz, contribuyendo a un aumento de la inflación, que inicialmente se estimaba como transitoria, pero que fue aumentando a lo largo del año activada por la escasez, retraso y encarecimiento de suministros y por el aumento de los salarios (especialmente en Estados Unidos), activados por la escasez de mano de obra en el mercado laboral. Además, la aparición de la variante ómicron a finales de noviembre, con las consiguientes políticas limitativas de la actividad económica (especialmente en Europa), determinó que la intensidad de la recuperación se desacelerase. No obstante, el balance económico del año 2021 terminó siendo positivo con un crecimiento del PIB mundial del 5,9 %, con lo que globalmente se recuperó el nivel económico precovid, aunque, de nuevo, las diferencias fueron significativas entre áreas y países: China, India, el resto de Asia, Estados Unidos y gran parte de África recuperaron el nivel de PIB de 2019, pero no lo alcanzaron la mayor parte de los países europeos, Japón, Canadá ni buena parte de América Latina.

1.1. Diferencias de la crisis con la Gran Recesión

La rápida recuperación de la economía mundial tras una fortísima contracción pone de manifiesto tanto la diferencia de la crisis económica derivada de la pandemia con la de la Gran Recesión iniciada en 2008, como el diferente papel de la política económica en ambas depresiones.

En relación con lo primero, la crisis iniciada en 2008 fue una crisis financiera provocada por la sobrevaloración de los activos inmobiliarios y el elevado endeudamiento bancario, que afectó primero al sistema financiero estadounidense, para extenderse posteriormente al sistema financiero internacional, y derivó en ajustes de la actividad y el empleo en todo el mundo. Por el contrario, la crisis económica desatada en marzo de 2020 es un shock exógeno a la economía provocado por la emergencia sanitaria de la COVID-19, que exigió limitar la movilidad personal y la actividad económica, lo que determinó primero un shock de oferta por la carencia de algunos suministros y, posteriormente, un shock de demanda por el drástico frenazo del consumo y la producción. En consecuencia, si la Gran Recesión exigió para superarla reducir los desequilibrios financieros en un largo y complejo proceso de desendeudamiento de particulares y empresas, la crisis iniciada en marzo de 2020 fueron dos shocks que no afectaron a la capacidad del sistema productivo ni al sistema financiero, por lo que era previsible que, si la pandemia se atajaba o controlaba en un plazo corto, la actividad podría retomarse casi al mismo nivel precedente. No obstante, la profundidad y duración de la crisis han provocado más alteraciones de lo que se preveía, pero la recuperación es una realidad, si bien con incertidumbres y mayores costes que los previstos.

La segunda diferencia con la Gran Recesión y, previsiblemente, la menor duración e impacto económico de la crisis provocada por la pandemia se deben a una política económica más decidida y eficaz que la aplicada entonces. Tanto los bancos centrales como los gobiernos de los países más desarrollados reaccionaron con rapidez y contundencia a los graves retos económicos con medidas de política monetaria, fiscal y regulatorias, que han tratado de proteger a los hogares y a las empresas y facilitar la recuperación. Entre las políticas monetarias destacan los multibillonarios programas de compras de bonos públicos y el mantenimiento de tipos de interés cero o muy bajos por parte de los bancos centrales, lo que ha facilitado una política fiscal expansiva a los gobiernos nacionales, con lo que han podido abordar cuantiosos programas sanitarios, inversiones públicas, ayudas públicas a sectores sociales con riesgos, al mantenimiento del

Tabla 2. Medidas fiscales en respuesta a la COVID-19 (Miles de millones de dólares. Enero 2020 a octubre 2021)

	Gasto adicional e ingresos no recibidos				Apoyo a la liquidez	
	Total	% PIB	Sector Salud	Sectores no Salud	Subtotal	% PIB
G20: Economías avanzadas	8.954					
Australia	250	18,4	14	236	24	1,8
Canadá	262	15,9	46	216	65	4,0
Unión Europea	488	3,8	0	488	873	6,8
Francia	253	9,6	39	214	399	15,2
Alemania	589	13,6	70	519	1.058	27,8
Italia	205	10,9	23	183	665	35,3
Japón	844	16,5	105	739	1.429	28,3
Corea	105	4,5	12	93	166	10,1
España	107	7,6	22	86	184	14,4
Reino Unido	522	16,2	131	391	453	16,7
Estados Unidos	5.328	25,4	687	4.641	510	2,4
Otras economías avanzadas	679					
G20: Mercados emergentes	1.215					
Argentina	21	4,5	5	16	10	2,0
Brasil	133	9,2	21	112	89	6,2
China	711	4,8	21	689	193	1,3
India	109	3,5	14	95	166	5,2
Indonesia	99	4,5	22	77	9	0,9
México	7	0,7	5	2	13	1,2
Rusia	74	4,5	11	63	22	1,5
Arabia Saudí	18	2,2	14	4	7	0,8
Sudáfrica	18	5,9	2	15	12	4,1
Turquía	25	2,7	3	22	69	9,5
Otros mercados emergentes	361					
Países de bajos ingresos	7,3					
Global	10.793	9,7	1.451	9.255	6.117	6,2

Fuente: FMI. Database on Fiscal Policy Responses to COVID-19

empleo y al apoyo a las empresas. Según el Fondo Monetario Internacional, las medidas fiscales desde enero de 2020 a octubre de 2021 elevan 10,79 billones de dólares en el mundo los gastos adicionales e ingresos no recibidos por las haciendas nacionales, a los que se suman 6,1 millones de dólares en apoyo a la liquidez de empresas e instituciones en forma de créditos y avales. En conjunto, una cantidad próxima al 16% del PIB mundial, una expansión fiscal histórica. Pero las diferencias por países han sido notables, con un volumen extraordinario en Estados Unidos, seguido por Australia, Japón, Reino Unido y Alemania. En general los países desarrollados han tenido mucha mayor capacidad para acometer programas de gasto, aunque en algunos, como España,

han sido más ajustados por sus restricciones financieras. Los países emergentes y en desarrollo han tenido menor capacidad financiera para abordar planes consistentes de recuperación, destacando no obstante Brasil y China.

En particular, la Unión Europea respondió de forma muy diferente ante ambas depresiones, pues si en la Gran Recesión tanto la Comisión como el Banco Central Europeo fueron reticentes a adoptar medidas de sostenimiento y recuperación y mantuvieron las exigencias de austeridad hasta el giro del BCE bajo la presidencia de Mario Draghi al final de 2011, en la crisis del coronavirus han respondido con presteza y contundencia. La Comisión Europea liberó tempranamente a los gobiernos de las restricciones de disciplina fiscal, el Banco Europeo de Inversiones aprobó un programa de garantía de préstamos a las pequeñas y medianas empresas, el Mecanismo Europeo de Estabilidad dotó un fondo para la compra de material y equipamiento sanitario y la Comisión aprobó un programa (SURE) para apoyar los seguros de desempleo nacionales. El Banco Central Europeo fue la institución que adoptó las decisiones más trascendentales, con la ampliación de los programas de compras de títulos ya existentes, la creación de un nuevo programa con mayores facilidades y la puesta a disposición de nuevos fondos a los bancos. A todo ello debe sumarse el complejo y anhelado acuerdo de la mutualización de deuda pública entre los Estados con el Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia para Europa, Next Generation EU, con los objetivos de apoyar a los países más afectados por la pandemia y mejorar la competitividad de la economía europea, singularmente para enfrentarse a los retos de la digitalización y la economía verde.

A la recuperación también está contribuyendo de forma desigual la capacidad de adaptación de la sociedad, con cambios en los hábitos de consumo, trabajo y ocio de los hogares, mientras que las empresas han abordado nuevas formas de producción y comercialización. Cambios que han estado facilitados por la digitalización, avanzando tendencias que pueden alumbrar cambios estructurales en los próximos años.

2. EL IMPACTO EN LA ECONOMÍA ESPAÑOLA

Tras la crisis financiera de 2008, la economía española inició en 2013 una recuperación que se fue intensificando hasta 2016, y continuó en los años siguientes, aunque con tendencia a la desaceleración. El dinamismo de la actividad económica durante los años de expansión se vio favorecido por el aumento del empleo y de los salarios reales, los bajos tipos de interés y un entorno internacional favorable. En esta dinámica, y aun con una tasa de crecimiento interanual del PIB del 1,7 % en el último semestre de 2019, el año 2020 comenzó con la misma tendencia, aunque con las perturbadoras noticias de un nuevo virus en China y las primeras restricciones en las cadenas globales de suministro por el cierre de las fronteras de ese país.

La pandemia pronto trasladaría su epicentro a Italia y a España, donde, tras restarle importancia inicialmente las autoridades sanitarias, la intensificación de los contagios, el aumento de los ingresos hospitalarios y de los fallecimientos obligaron al gobierno a la declaración del estado de alarma el 14 de marzo. Las medidas adoptadas para contener la pandemia, basadas en restricciones a la movilidad y a la actividad económica fueron de las más severas del mundo, con el confinamiento de la población y el cese de toda actividad no considerada esencial, por lo que a la inicial crisis de oferta pronto se unió una crisis de demanda derivada del confinamiento, con una reducción del consumo y aún más intensa de la inversión, acentuando la contracción de la actividad económica. Aunque las medidas de contención solo se aplicaron durante poco más de dos semanas del primer trimestre, el impacto provocó una reducción del PIB del 5,4 % respecto al trimestre anterior y del 4,3 % respecto al primer trimestre de 2019.

El estado de alarma se prolongó casi 100 días (hasta el 21 de junio), restringiéndose severamente la movilidad personal y las actividades económicas no esenciales, por lo que, si bien las limitaciones a la movilidad de la población se redujeron desde el 27 de abril, en el segundo trimestre del año se produjo una contracción histórica de la actividad económica, con caída del PIB del 17,7 % respecto al trimestre anterior y del 21,5 % en términos interanuales.

Después de la intensa caída del PIB en el segundo trimestre, la retirada gradual de las limitaciones a la movilidad y a la actividad desde mediados de mayo impulsó una notable reactivación de la economía, más visible a partir del mes de julio con la apertura de las fronteras al tráfico aéreo. Sin embargo, la proliferación de rebrotes de la epidemia en agosto exigió la adopción de nuevas medidas restrictivas al turismo desde los principales países emisores y la aparición en septiembre de signos claros de que la recién iniciada recuperación de la economía se estaba frenando. Los nuevos contagios obligaron a intensificar las restricciones a la movilidad y a la actividad, lo que limitó la recuperación en los últimos meses del año, aunque no se logró evitar la extensión de una transmisión comunitaria que acabaría conformando una segunda y más virulenta ola de contagios, y que el balance anual de la economía española se saldase con un retroceso del PIB del 10,8 %, el más elevado de los países de la OCDE.

La flexibilización de las medidas de control de la pandemia adoptada antes del período navideño desembocó

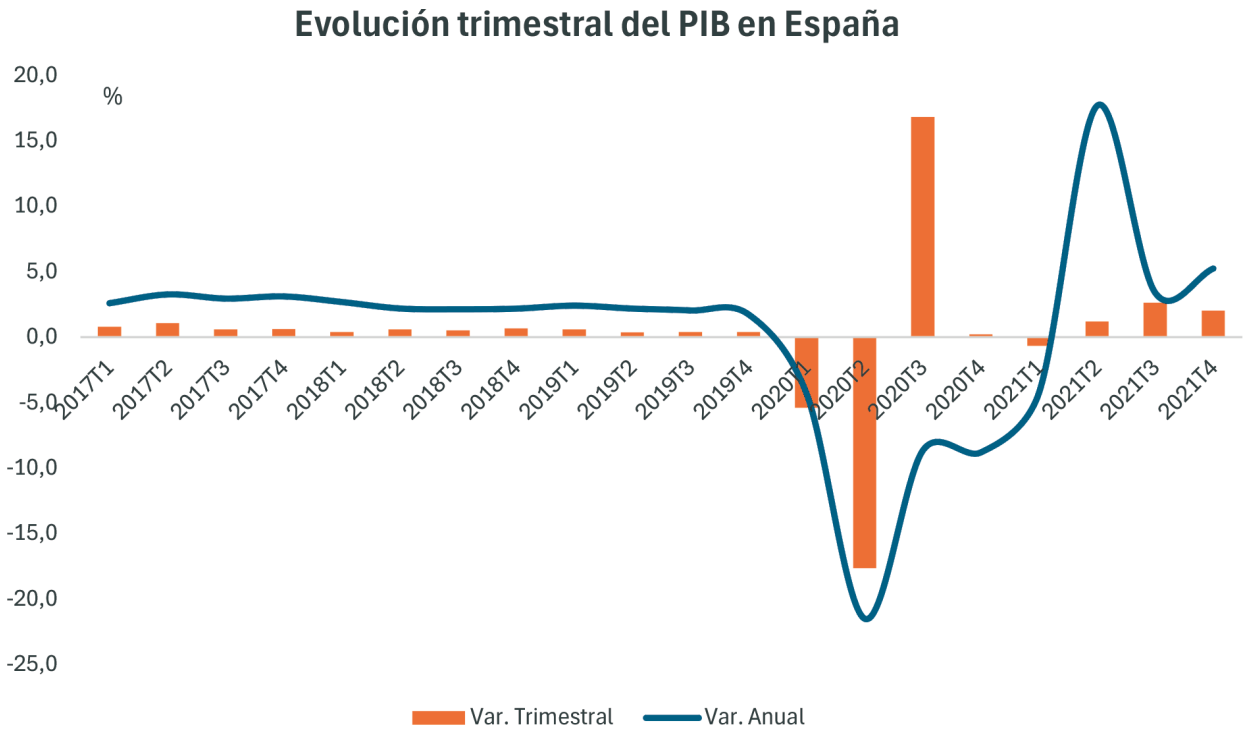


Figura 1. Gráfico de evolución trimestral del PIB en España

en una tercera oleada de contagios que se prolongó durante los meses de enero y febrero de 2021. Las favorables expectativas despertadas por la campaña de vacunación se vieron frustradas ante los problemas de suministro de vacunas en la UE, por lo que en los primeros meses de 2021 se acentuó la contracción de la actividad económica en un marco de incertidumbres y de retracción del consumo y la inversión. No obstante, el suministro regular de vacunas y la adaptación progresiva de la producción y de la demanda a las condiciones impuestas por la pandemia permitieron una recuperación progresiva de la actividad desde el mes de marzo, que se intensificó a lo largo de la primavera con la relajación de las restricciones, el final del estado de alarma y la creciente confianza en la eficacia de la vacunación. Todo ello generó un aumento de la confianza y del consumo, estimulado este por el notable aumento del empleo y por la mayor disposición de los consumidores a reducir parcialmente el ahorro acumulado.

A pesar de que la mayor parte del verano estuvo dominada por una nueva ola de contagios asociada a la variante delta del virus, la menor incidencia sanitaria en términos de fallecimientos e ingresos hospitalarios permitió continuar con la relajación de las medidas restrictivas, lo que favoreció el crecimiento económico, aunque a un ritmo de recuperación más moderado. El consumo de los hogares frenó su dinámica expansiva, pero se contó con el empuje del turismo nacional y, en menor medida, del internacional que, si bien se recuperó respecto al año anterior, se vio afectado de nuevo por las restricciones en los países emisores. También crecieron las exportaciones, favorecidas por la recuperación del comercio mundial.

Sin embargo, en el cuarto trimestre del año la recuperación se debilitó por dos motivos. Por una parte, por las alteraciones de las cadenas de suministro, las restricciones al comercio internacional por la escasez y carestía de fletes marítimos y por el encarecimiento de materias primas y componentes para la producción, muy singularmente por la elevación de los precios de la energía, lo que confluyó en un aumento histórico de la inflación (6,5 % de diciembre de 2021 a diciembre de 2022). Por otra parte, el segundo factor de incertidumbre ha sido el sanitario con la propagación intensísima de la variante ómicron del coronavirus, con elevada facilidad de transmisión, aunque con menor gravedad. Estas circunstancias redujeron el crecimiento del PIB del cuarto trimestre al 2 %, y el del conjunto del año al 5 %, lejano a la previsión del gobierno (6,5 %).

En consecuencia, el balance económico de los dos años de pandemia es un retroceso del PIB del 6,4 %, el mayor entre los países desarrollados. Una contracción del PIB a la que se suman otros indicadores económicos relevantes, como los recogidos en un análisis de *The Economist* de finales del año, según el cual España también ocupaba las últimas posiciones en la evolución de los ingresos familiares (cayeron el 6,3 %) y en el comportamiento del mercado de valores, y la penúltima en inversiones empresariales. La acumulación de indicadores negativos pone

de manifiesto que la economía española no solo está sufriendo con más gravedad la pandemia y que se está quedando descolgada de la recuperación de los países desarrollados, sino que existen problemas estructurales que condicionarán nuestro desarrollo económico futuro.

¿Por qué la crisis en España ha sido más profunda en 2020 que en otros países desarrollados y la recuperación en 2021 menor de la esperada? Los factores que pueden ayudar a explicarlos son múltiples. El más comúnmente señalado es que en la especialización productiva tienen gran peso las actividades con un elevado grado de interacción social, tales como el comercio, el transporte, la hostelería y las actividades artísticas y recreativas. Estas actividades están participadas en mayor o menor medida por la demanda turística, que aporta el 12,4 % del PIB español, y se vieron intensamente afectadas con las restricciones del estado de alarma en 2020, y en 2021 no han recuperado el nivel prepandémico por restricciones a la movilidad internacional. Otras especializaciones productivas también han jugado negativamente, siendo el caso más significativo el de la automoción, sector que en España tiene un peso importante (segundo fabricante europeo después de Alemania), y que atraviesa una crisis de reconversión, además de los propios efectos vinculados a la crisis.

Otro factor explicativo se encuentra en algunas características del sistema productivo, singularmente la elevada proporción de autónomos y pequeñas empresas, con mayor fragilidad financiera para resistir el embate de una crisis de demanda de la intensidad de la sufrida en 2020. A ello se suma un mercado de trabajo con la más elevada tasa de temporalidad de los países de la OCDE, lo que facilita el desempleo ante una situación de crisis.

También se esgrime como causa explicativa de la mayor contracción económica de España, especialmente en el primer estado de alarma, la mayor severidad de las medidas restrictivas a la movilidad que en los países del entorno europeo, aunque también contuvieron los contagios con más efectividad.

Finalmente, la política económica de sostenimiento y recuperación de la demanda y las empresas, aun siendo importante y decisiva para el mantenimiento del empleo y para evitar el cierre masivo de empresas, fue de menor entidad que en la mayor parte de países desarrollados, como ponen de manifiesto los datos disponibles de ampliación del gasto y los ingresos no recibidos desde enero de 2020 a octubre de 2021: el 7,6 % del presupuesto, mientras que en Alemania fue del 13,9 %, en Francia del 9,6 % y en Italia del 10,9 %. Las medidas de apoyo a la liquidez fueron más elevadas (14,4 % del PIB), aunque también superadas por Alemania (27,8 %), Francia (15,2 %) e Italia (35,3 %), lo que se puede explicar por los elevados niveles de deuda y déficit públicos.

Como se ha expuesto con anterioridad, la rápida reacción de las políticas económicas a escala global permitió mitigar el fuerte impacto negativo de la pandemia sobre la actividad económica, siendo de particular relevancia para la economía española la expansión de liquidez del Banco Central Europeo y las diversas iniciativas de la Comisión Europea, singularmente la temprana decisión de relajar las exigencias fiscales a los Estados miembros.

Por su parte, las iniciativas gubernamentales en España han sido semejantes a las del resto de los países europeos, aunque con instrumentos específicos y con intensidades diferenciadas. Estas iniciativas han tenido como objetivos dotar de mayores recursos al sistema sanitario, proteger el empleo, apoyar a los hogares más vulnerables y proveer de liquidez a las empresas. Con este último objetivo destacan las distintas líneas de avales públicos a través del Instituto de Crédito Oficial para favorecer el crédito bancario a las empresas, así como el aplazamiento de obligaciones fiscales para pequeñas empresas y otras ayudas de cobertura aseguradora para pymes exportadoras. A estas medidas de los primeros meses de la pandemia se le sumaron en 2021 programas de apoyo a sectores económicos para evitar su insolvencia, aunque el retraso y su menor entidad en relación con los de otros países europeos han limitado su efecto.

El gobierno de la nación y la mayor parte de las comunidades autónomas también han puesto en marcha diversas iniciativas de apoyo a los sectores más vulnerables y a las personas más expuestas a las consecuencias de la pandemia. Entre todas ellas destaca por su entidad y carácter estructural la aprobación del Ingreso Mínimo Vital, una medida de garantía de renta mínima semejante a la que existe en otros muchos países europeos, pero su implementación ha sido más lenta y restrictiva de lo que hubiese sido deseable para que jugase un papel relevante en la lucha contra la exclusión en el marco de la crisis sanitaria.

Posiblemente la iniciativa gubernamental de mayor éxito ha sido la consideración de la pandemia como causa de fuerza mayor para activar un Expediente de Regulación Temporal de Empleo (ERTE), lo que ha contribuido en gran medida al mantenimiento de las empresas y a la protección de los trabajadores. La agilización y simplificación de la tramitación y la cobertura por la Seguridad Social de los pagos de los trabajadores han ayudado notablemente a flexibilizar las relaciones laborales en un contexto muy complejo, salvando a muchas empresas del cierre y evitando el despido de muchos trabajadores. Su éxito ha motivado sucesivas prórrogas y a abordar un programa de prestaciones extraordinarias a los autónomos por cese de actividad y exoneración del pago de cotizaciones.

Como consecuencia de estas actuaciones el **impacto en el desempleo** ha sido muy inferior al previsible dada la

profundidad de la contracción económica, especialmente en el primer semestre de 2020, cuando el PIB disminuyó un 23,1 %, mientras que el número de desempleados solo disminuyó en un 5,5 %, según la Encuesta de Población Activa (EPA), y la tasa de paro pasó del 13,8 % de la población activa al 15,3 %, tasa que se redujo en el último trimestre de 2021 al 13,3 %, la más baja en 14 años. Aún más significativo ha sido el comportamiento del mercado de trabajo según las informaciones proporcionadas por la Seguridad Social hasta diciembre de 2021, cuando se contabilizó el mayor descenso anual del paro de la serie histórica, llevando la cifra a 3.105.905 personas, 140.142 parados menos que en febrero de 2020, antes del estallido de la crisis sanitaria, si bien entre estos no se incluyen las 102.548 personas incluidas en ERTE activos. Además, el número de afiliados a la Seguridad Social en diciembre de 2021 (19.824.911) superó en 362.613 los cotizantes en febrero de 2020. Un aumento tan intenso que está provocando un aumento de vacantes en puestos de trabajo, especialmente en algunas actividades, como información y comunicaciones, transporte, hostelería y construcción, a pesar de que se mantienen altas tasas de paro.

Lo sorprendente es que la recuperación del empleo y la disminución del paro se produce en el marco de una fuerte contracción de la actividad económica, lo que determina un descenso de la productividad del trabajo del 4,8 % desde el inicio de la crisis. Este comportamiento difiere de recesiones anteriores, en las que empleo disminuía con más intensidad que la actividad en las fases recesivas. El descenso de la productividad se podría explicar por la contabilización como ocupados de los empleados en situación de ERTE, por el aumento del empleo público, por la disminución de las horas trabajadas (casi un 4 %) o por la recuperación del empleo en actividades intensivas en trabajo, hostelería, construcción y otros servicios de baja productividad. Lo cierto es que la baja productividad constituye una restricción económica hacia el futuro, ya que es la variable clave para el crecimiento sostenible a medio plazo, y España tiene un diferencial de productividad negativo con la UE y la OCDE.

3. EFECTOS Y TENDENCIAS SOCIOECONÓMICAS PROVOCADAS POR LA PANDEMIA

El grave impacto sanitario y económico de la pandemia y su centralidad en la vida de la humanidad ha provocado múltiples efectos sociales y económicos. Algunos de ellos pasajeros o poco trascendentes, pero otros pueden significar cambios o tendencias relevantes para la humanidad. A continuación, se exponen algunos de los cambios que se perciben sin ánimo de exhaustividad.

3.1. Aumento del papel del Estado

El debate sobre la intervención del Estado en la economía ha sido permanente en la historia del capitalismo, sucediéndose fases en las que las ideas favorables a mayor intervención han prevalecido sobre otras en las que la oposición al intervencionismo ha sido predominante. No obstante, desde la segunda guerra mundial, si bien han existido fases que han frenado el intervencionismo en algunos países, como la protagonizada por los gobiernos de Thatcher y Reagan, la tendencia dominante ha sido hacia un aumento de la intervención, favorecido tanto por la demanda ciudadana de mayores transferencias y servicios sociales, como por el interés de los políticos por ampliar su ámbito de gestión y poder, y porque los servicios públicos experimentan menores ganancias de productividad, lo que los va convirtiendo en relativamente más caros y aumentando el peso del gasto público en el PIB.

De nuevo ahora el peso del Estado tiende a aumentar porque se intensifican algunos determinantes que ya existían (más necesidades de atención a los mayores por el aumento de la esperanza de vida, mayor sensibilidad por la protección a los más vulnerables de las desigualdades educativas y de renta), y porque otros factores irrumpen demandando atención y gasto público. Entre ellos, la preocupación por el cambio climático, que exige la intervención pública al ser un problema que el mercado no puede resolver por sí solo. Y, por otra parte, la crisis del coronavirus, que no solo está exigiendo un aumento del gasto público para hacer frente a la pandemia, sino que está provocando una mayor demanda de protección sanitaria pública. Como consecuencia de este conjunto de factores, la intervención reguladora y el gasto público están aumentando en la generalidad de los países desarrollados desde el inicio de la pandemia, y es previsible que este aumento se convierta en estructural.

El riesgo de una creciente intervención del Estado es, según algunas instituciones, la posible limitación de las libertades y el deterioro de la democracia. El «Índice de Democracia Global', elaborado por la «Unidad de Inteligencia» de *The Economist*, pone de manifiesto que el declive continuado de la democracia en el mundo desde 2014 (5,57 puntos) se acentuó en 2020 (5,37) y 2021 (5,28) por las restricciones adoptadas por los gobiernos a los viajes y a las libertades civiles, que se suspendieron tanto en las democracias desarrolladas como en los regímenes autoritarios. España se mantiene en la posición 24 entre los 167 países incluidos en el índice. También el «Índice de Libertad Económica 2022» de «Heritage Foundation», observa que las restricciones adoptadas por los gobiernos para contener el impacto sanitario de la pandemia han debilitado la libertad económica a nivel global.

Un índice que subió de 59,7 en 2010 a 61,6 en 2019, y que descendió en 2021 hasta 60. España, con 68,2 puntos, se sitúa en la posición 41 del *ranking* global, y en la 24 de la UE.

3.2. Inflación

La inflación es un fenómeno distorsionador para el buen funcionamiento de los mercados, por lo que su control en niveles bajos (2 % anual) es una de las misiones justificativas de los bancos centrales y de su autonomía. Este objetivo de la política monetaria y otros factores, como el desarrollo tecnológico y el efecto de la globalización en la moderación salarial, han determinado que las elevadas tasas de inflación de las décadas de los setenta y ochenta del siglo pasado se hayan desterrado de los países desarrollados desde hace varias décadas, lo que se acentuó tras la Gran Recesión, cuando la inflación dejó de ser un problema y permitieron que los bancos centrales inyectasen dinero en los mercados y bajasen los tipos de interés para estimular el crecimiento económico.

Sin embargo, cuando nadie lo esperaba, la inflación ha resurgido en 2021 como consecuencia de factores tanto de oferta como de demanda, muchos de ellos con la pandemia como motivación. Por una parte, y como se ha referido, la ruptura de las cadenas de suministro globales, iniciada con el confinamiento en China y su extensión a otros países asiáticos, se hizo crítica con la recuperación de la demanda y el agotamiento de los inventarios en 2021. El aumento de la demanda con la recuperación en ese año también se trasladó a algunas materias primas y productos alimenticios siendo algunos sectores incapaces de responder a estos aumentos. No obstante, quizá el factor más significativo (especialmente para España) fue la subida de los precios de la energía, motivada a su vez por una combinación de factores: aumento de la demanda de energía, tensiones políticas internacionales que han afectado al suministro de gas y efectos indirectos de las políticas contra el cambio climático (desincentivo a la inversión en explotación, tratamiento y transporte de combustibles fósiles y encarecimiento de los derechos de emisión de CO_2). El continuado aumento de la inflación desde la primavera empezó a trasladarse a los precios de otros productos y servicios, y también a los salarios, especialmente en un país como Estados Unidos con pleno empleo.

Al finalizar el año 2021 la inflación se ha generalizado en todos los países desarrollados, especialmente Estados Unidos con una tasa anual del 7 %, mientras que en la UE se alcanzó una tasa del 5,3 % y España del 6,5 %. Al aumento de la inflación provocado por las razones de oferta y demanda comentadas, se suman los temidos «efectos de segunda ola» en forma de elevación de los salarios y subida de los precios de diversos bienes y servicios, provocando una espiral inflacionista con graves efectos distorsionadores en la economía y de difícil contención para la política económica. Hasta final del año 2021 han empezado a producirse efectos de esta naturaleza en Estados Unidos, motivados por el pleno empleo técnico y por «la gran dimisión» de población activa del mercado de trabajo, a la que posteriormente se hará referencia, pero en España, a pesar del deterioro de la capacidad adquisitiva, la subida salarial media pactada en los convenios colectivos cerrados hasta diciembre solo fue del 1,47 %, afectando a 7,67 millones de trabajadores, pero previsiblemente aumentará en 2022.

En los comienzos de las tensiones inflacionistas los bancos centrales y los analistas habían venido manteniendo que la inflación sería un fenómeno transitorio que se resolvería cuando se normalizasen los cuellos de botella en las cadenas de suministro, lo que podría ocurrir al final del primer semestre de 2022, pero con el tiempo se percibe más improbable una reducción significativa de la inflación a corto plazo, porque es poco previsible una caída consistente de los precios de la energía y de los costes asociados con la transición verde, y porque la espiral precios-salarios no puede descartarse.

3.3. Déficit y deuda pública

La pandemia ha disparado el gasto público en todo el mundo, lo que, combinado con una reducción generalizada de los ingresos impositivos, ha propiciado déficits públicos muy elevados, que se han tenido que financiar con deuda pública, elevándose a 296 billones de dólares (353 % del PIB), niveles inaceptables hasta hace poco tiempo. Esta deuda se sostiene por su compra y respaldo por los bancos centrales, y porque los tipos de interés se han mantenido próximos a cero, pero, si se mantienen los altos niveles de inflación, los bancos centrales tendrán que elevar los tipos de interés y abandonar las compras de deuda, como ya se ha anunciado. Si este cambio de la política monetaria se produjese abruptamente podría provocar una grave crisis en el sistema financiero, pero antes o después los bancos centrales tendrán que actuar ante el riesgo de una inflación sostenida que amenaza el crecimiento en el medio plazo.

En España el déficit público se disparó con la Gran Recesión y las intervenciones públicas para sanear el sistema financiero. Desde entonces, se han venido arrastrando unos niveles de déficit y deuda muy elevados (a pesar de los compromisos de consolidación fiscal en el marco de la Eurozona), que se situaban en el 2,9 % del PIB de déficit y el 95,5 % de deuda en 2019. El aumento del gasto sanitario, las políticas de sostenimiento y la contracción de los ingresos fiscales en 2020 elevaron

el déficit público al 11% del PIB, lo que exigió un aumento de la deuda de 170.000 millones de euros, elevándola hasta el 120% del PIB. Esta deuda aumentó en 2021 hasta 1,43 billones de euros, aunque su porcentaje sobre el PIB se redujo al 118,7% gracias al crecimiento del PIB.

En una economía con elevadas tensiones inflacionistas y fuertes desequilibrios financieros, instituciones como el Fondo Monetario Internacional, el Banco de España o la Autoridad Independiente de Responsabilidad Fiscal han alertado sobre la vulnerabilidad de la economía española ante una política monetaria más restrictiva de los bancos centrales, y reclaman al gobierno español la puesta en marcha de un programa de consolidación fiscal a medio plazo.

3.4. Globalización

A la contracción del comercio internacional producida en el primer semestre de 2020 como consecuencia del severo confinamiento y el cierre de numerosas fábricas en China, se sumaron la caída de las exportaciones de otros países proveedores de productos y equipos sanitarios, componentes y productos intermedios críticos para la producción de múltiples productos en todo el mundo, y también los problemas logísticos, poniendo de manifiesto la dependencia de los países desarrollados de los suministros exteriores de ciertos productos y componentes, singularmente los semiconductores. Estas dificultades han revitalizado un cierto nacionalismo económico por los riesgos de dicha dependencia, e incluso se ha llegado a responsabilizar a la globalización de la rápida expansión de la pandemia, planteándose la necesidad de una mayor autonomía productiva y el fortalecimiento de la industria nacional. Sin embargo, aunque en Estados Unidos y la Unión Europea se han planteado políticas para renacionalizar y diversificar algunos suministros, las cadenas de valor global son redes complejas constituidas por numerosísimas empresas sobre la base de la competitividad que son imposibles de sustituir eficientemente, por lo que es difícil que se produzca una marcha atrás del proceso de globalización. No obstante, los problemas derivados de la invasión rusa de Ucrania pueden provocar un freno temporal en los intercambios comerciales.

En cualquier caso, el comercio internacional empezó a recuperarse ya en el segundo semestre de 2020 y en 2021 creció un 9,3%, si bien siguen existiendo restricciones en la provisión de algunos suministros industriales.

3.5. Desigualdad y pobreza

El impacto socioeconómico de la covid está siendo muy desigual en el mundo, tanto territorialmente como por los niveles de ingresos. La información del Banco Mundial sobre este impacto pone de manifiesto un efecto más negativo en el PIB (-4,49%) en los países de alto nivel de ingresos (más de 12.696 euros por persona y año, y el 16% de la población mundial), que en los países de ingresos medios (entre 1.450 y 12.995 dólares anuales y 75% de la población mundial) cuya reducción del PIB fue -1,38%, y menor impacto aún en los países de bajos ingresos (menos de 1.450 dólares anuales y 9% de la población) en los cuales el PIB creció un 0,62% en 2020, aunque en los tres grupos de países existe una gran variedad de comportamientos.

Para el año 2021 no se dispone de estadísticas del PIB para todos los países, pero del cuadro del FMI del primer epígrafe se desprende que se recuperaron los niveles de producción mundial, pero de forma más intensa entre las economías emergentes y en desarrollo que en las economías avanzadas y, entre estas, en Estados Unidos, pues aún no se ha recuperado el nivel de PIB de 2019 en las grandes economías de la Eurozona, ni en Reino Unido, Japón o Canadá. Será necesaria más información estadística y mayor perspectiva analítica para obtener conclusiones bien fundamentadas, pero con los datos disponibles parece derivarse que la mayor parte de los países con menor nivel de desarrollo han sufrido la covid con menor intensidad, posiblemente por la mayor juventud de su población y por la menor dependencia económica en la mayor parte de los países de las relaciones e intercambios internacionales. Pero debe hacerse notar que sus restricciones presupuestarias pueden limitar hacia el futuro las políticas de recuperación y, por otra parte, que la menor contracción económica no ha impedido que en los países más pobres haya aumentado los niveles de pobreza más severos.

Según el Banco Mundial los sucesivos brotes de COVID-19 han aumentado en 100 millones el número de personas en extrema pobreza (menos de 1,9 dólares al día), elevándolas a 750 millones de personas, en especial en África y Asia, a la vez que el 0,001% de la población más rica aumentó su riqueza en un 14%. También un informe de diciembre de 2021 del World Inequality Lab concluía que un mundo más desigual es el legado inmediato de la pandemia, pues la brecha entre ricos y pobres siguió creciendo entre 2019 y 2021 al aumentar la concentración patrimonial en los más ricos, aumento favorecido por la fuerte subida de los mercados bursátiles y por la pérdida de ingresos salariales, intensificándose el proceso de concentración de riqueza que arrancó en la década de los ochenta.

En España la pobreza y la desigualdad aumentaron notablemente con la Gran Recesión, y empezó a recuperarse en 2014, pero de nuevo aumentaron en 2020 como consecuencia de la pandemia y sus secuelas económicas. La pobreza grave aumentó en 2020 hasta el 7% de

la población (3,3 millones de personas según la Encuesta de Condiciones de Vida del INE), muy superior al 4,7 % de 2019, pero sin superar los peores niveles de la Gran Recesión gracias a la aplicación de políticas de sostenimiento de rentas. Respecto a la evolución de la desigualdad solo existen estimaciones preliminares del Banco de España que apuntan a que las diferencias de renta se intensificaron notablemente.

3.6. Cambios en la producción y el consumo

Además de los cambios globales referidos, se están produciendo transformaciones tecnológicas que afectan a las formas de producción, de consumo y de vida, lo que modificará la estructura de la producción con el aumento del peso de algunas actividades económicas, mientras que otras pierden relevancia, incluso queden obsoletas. Las tecnologías, las instituciones, los valores sociales, la producción y el consumo interactúan con influencias en múltiples direcciones. Sus dinámicas son en muchos casos anteriores a la pandemia, pero ésta las ha acelerado o ha impulsado nuevos cambios.

La pandemia ha provocado un notable aumento de la demanda de tecnología digital, particularmente de ordenadores, teléfonos inteligentes y electrónica de consumo. Hacia el futuro se prevé un gran aumento de la inversión empresarial para impulsar el aumento de la productividad, fundamentalmente en robotización e inteligencia artificial, pero también en sanidad, biotecnología, realidad virtual, finanzas descentralizadas y para la transición a la economía verde, para lo que se requerirá almacenamiento de energía, electrificación de los vehículos, o viviendas energéticamente eficientes.

Las facilidades tecnológicas para el teletrabajo se han aprovechado durante la pandemia para acomodar la continuidad del trabajo a las restricciones a la movilidad, y también para conciliar la vida personal y familiar. Es un cambio en la organización del trabajo que quizá no se mantendrá con la misma intensidad que en las fases de confinamiento más restrictivas, pero sí parece haber adquirido algunos rasgos permanentes, aunque sea en formas de trabajo híbridas, lo que tendrá una variada incidencia: exceso de capacidad de las oficinas, demanda creciente de viviendas multifuncionales, más amplias y desplazándose la preferencia a la periferia de las ciudades, reducción del transporte, singularmente de los viajes de negocios, y más particularmente los largos desplazamientos aéreos.

La pandemia también ha traído algunos cambios en los valores y preferencias de los ciudadanos. Entre ellos, una mayor preocupación por la salud, con la consiguiente demanda de más y mejor atención sanitaria, lo que en países como España se traduce tanto en mayor gasto sanitario público como en mayor gasto en sanidad privada. Por otra parte, las crecientes evidencias y manifestaciones de científicos y responsables públicos sobre el deterioro ambiental y los riesgos del cambio climático van incidiendo en la sociedad, con trascendencia en la regulación (transición verde, limitación de emisiones de gases de efecto invernadero, energías renovables) y en los valores colectivos (preferencia por consumo sostenible, economía circular, alimentación menos intensiva en proteínas de origen animal, etc.).

La pandemia ha provocado un aumento notable de la mortalidad en el mundo, especialmente de personas de edades avanzadas, lo que ha reducido de forma significativa la esperanza de vida. Se observa asimismo un reforzamiento de la vida en el hogar, que tiene su traducción en la expansión del comercio electrónico y la mayor frecuencia del consumo no presencial, con el aumento del servicio de comida a domicilio o de consumos digitales en *streaming*, y hacia el futuro demanda de viviendas más amplias, en las que se pueda compatibilizar vida y trabajo.

Un fenómeno que se ha observado desde que la economía comenzó a mejorar en el cuarto trimestre de 2020 en Estados Unidos y la Unión Europea es el aumento del número de vacantes de puestos de trabajo, mientras que la tasa de desempleo se mantenía prácticamente estable. Para este fenómeno, contrario a la experiencia internacional en los últimos veinte años expresada en la «curva de Beveridge», se esgrimen dos interpretaciones diferentes o complementarias: una es el desajuste de los mercados de trabajo, que no facilitan el emparejamiento de la oferta y la demanda por el desacoplamiento de las cualificaciones de los oferentes a las demandadas por las empresas. La otra explicación es un fenómeno novedoso que se le ha denominado «la gran dimisión», según la cual la recuperación de las vivencias de la vida familiar en el tiempo de confinamiento ha hecho reflexionar a muchas personas sobre el empleo de su tiempo y han optado (en muchos casos, no de forma perdurable) por vivir con menos ingresos y disponer de más tiempo libre. Según el Departamento de Trabajo de Estados Unidos, en noviembre de 2021 más de cuatro millones de personas habían dejado sus empleos. También en Europa, especialmente en Francia y Reino Unido, se está produciendo esta fuga de puestos de trabajo, aunque no se disponen de estimaciones cuantitativas.

Finalmente, durante los dos años de pandemia se ha producido una intensa reducción de la actividad turística por las restricciones a la movilidad, por el cierre de fronteras en algunos casos y por prevención en otros. En el caso de España ya se señaló la fuerte reducción del turismo en 2020, que se recuperó parcialmente en 2021 gracias al turismo nacional, mientras que el volumen de turismo exterior quedó lejano del récord logrado en 2019.

Hacia el futuro se prevé una paulatina recuperación, pero sin alcanzar los niveles turísticos prepandemia a corto plazo, y se debate si la prevención al riesgo y otros condicionantes podrían limitar los grandes desplazamientos turísticos en el futuro.

Estos cambios o nuevas tendencias tecnológicas, productivas y de estilos de vida están determinando que ciertas actividades estén adquiriendo mayor peso en la estructura de la producción, como son las actividades de I+D+i, digitalización, biotecnología, sanidad o comercio electrónico, mientras que otras actividades o sectores disminuyen su peso relativo (comercio tradicional, automoción, transporte aéreo, construcción aeronáutica, banca), y que algunos sectores (construcción de viviendas, agroindustrias) deban remodelar su oferta para atender las nuevas demandas.

BIBLIOGRAFÍA

BANCO DE ESPAÑA (2022), Boletín Económico 4/2021.

BANCO DE ESPAÑA (2021), Informe anual 2020.

BANCO MUNDIAL (2022a), Informe anual 2021. De la crisis a la recuperación verde, resiliente e inclusiva.

BANCO MUNDIAL (2022b), Resumen del año 2021 en 11 gráficos: la pandemia de la desigualdad.

COMISIÓN EUROPEA (2021), El Fondo de Recuperación y Resiliencia.

FERRARO, F. & MESA, E. (2020), La crisis del coronavirus y la economía andaluza. Impacto, tendencias y recomendaciones, en Fundación Pública Andaluza Centro de Estudios Andaluces. Colección Actualidad n.º 88.

FONDO MONETARIO INTERNACIONAL (2022), World Economic Outlook, enero 22.

FONDO MONETARIO INTERNACIONAL, World Economic Outlook Databases.

FONDO MONETARIO INTERNACIONAL, Database on Fiscal Policy Responses to COVID-19.

GOBIERNO DE ESPAÑA (2021), Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia.

ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO (2021), Perspectivas económicas de la OCDE, informe provisional de septiembre de 2021.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DEL TRABAJO (2022), https://ilostat.ilo.org/topics/covid-19/

THE ECONOMIST (2021), ¿Qué economías lo han hecho mejor y peor durante la pandemia? 26 de diciembre de 2021.

THE ECONOMIST. UNIDAD DE INTELIGENCIA (2021), Un nuevo punto bajo para la democracia global.

THE HERITAGE FOUNDATION (2022), 2022 Index of Economic Freedom.

WORLD INEQUALITY LAB (2022), World Inequality Report 2022.

Capítulo XI
Turismo y COVID-19. Una mirada hacia adelante

Cristóbal Casanueva Rocha
Departamento de Administración de Empresas y Marketing. Universidad de Sevilla

INTRODUCCIÓN

Mientras se escribe este capítulo se están cumpliendo dos años desde que todo empezó, desde que las vidas de toda la humanidad se han visto trastocadas (desgraciadamente interrumpidas en demasiados casos) en aspectos tan variados como la salud en todas sus formas, la economía, la existencia social y personal, los estilos de vida, el modo en que se consume, la velocidad a la que se asume la tecnología, la visión del mundo, etc.

Han sido dos años de incertidumbre que poco a poco ha ido disminuyendo gracias básicamente a los avances en distintas áreas de la investigación médica, farmacéutica o biológica (de las que se da buena cuenta en otros capítulos de este libro), además de las distintas experiencias políticas, económicas y sociales que se han desarrollado con diferentes niveles de éxito. Sin embargo, en todos los contextos se han producido idas y venidas, pasos hacia delante y hacia atrás, evidencias que contradecían lo que se daba por hecho y un ruido ensordecedor sobre todo lo que tiene que ver con la COVID-19, haya sido intencionado o no.

El turismo no ha sido ajeno a este tsunami. De hecho, el fenómeno turístico, su propia lógica basada en los viajes, las empresas del sector (particularmente, las aerolíneas y la hostelería), sus empleados y el papel del mismo en la economía, han sido tema de conversación en los medios de comunicación, en la academia y en las conversaciones informales.

Los decisores públicos han prestado una especial atención al turismo durante estos dos años, forzados por el alto impacto que ha tenido en el mismo la pandemia y por el alto porcentaje que representa en la economía y en el empleo.

La historia reciente del turismo a nivel mundial ha sufrido diferentes momentos de crisis, normalmente derivadas de su sensibilidad a cambios y a dificultades de distinta naturaleza, sean políticas, como las derivadas del 11-S; económicas, como la financiera de 2008; naturales, como tsunamis, terremotos, erupciones...; o sanitarias, como lo ocurrido con SARS o Ébola.

Sin embargo, la crisis derivada de la COVID-19, por su profundidad, por su repercusión global, por sus ramificaciones en otros ámbitos y por el alto grado de incertidumbre que ha generado, no puede ser comparada ni analizada como las anteriores. De hecho, aunque existe una importante literatura en el ámbito de turismo sobre gestión de crisis y sobre crisis sanitarias y pandemias anteriores (para una revisión, véase Kaushal y Srivastava 2021), poco se puede aprender de ellas para extender sus conclusiones a un caso tan radical como el de la COVID-19, que tendrá un impacto mayor que cualquiera de las anteriores (Sigala 2020). Por esto mismo cualquier comparación con las tendencias del pasado tiene poco sentido y en la investigación sobre el impacto de la COVID-19 en la actividad turística se ha recurrido en estos meses, sobre todo a técnicas prospectivas y cualitativas y a modelos normativos para ayudar o apoyar la toma de decisiones en los distintos ámbitos. Los datos disponibles a nivel agregado muestran una caída del turismo, medida por el descenso de llegadas internacionales, de alrededor de un 70% respecto a la actividad prepandemia en los años 2020 y 2021. Y la opinión de los expertos de la Organización del Turismo es que no

empiece la recuperación hasta finales de 2022 o de 2023 (UNWTO 2022).

Estas cifras están justificadas por el impacto que las distintas medidas que han intentado limitar la expansión de la COVID-19 y sus consecuencias más gravosas han tenido de forma particular en el turismo. Las restricciones a la movilidad son la principal causa. El cierre de fronteras nacionales o las limitaciones para los viajeros provenientes de algunas zonas o países, los impedimentos a los movimientos a nivel nacional, sea entre regiones o entre localidades, o las dificultades en la red de transporte público, especialmente la caída del tráfico aéreo, han impedido los viajes en gran medida. Por otra parte, el confinamiento en muchos países y zonas durante períodos prolongados de tiempo, las cuarentenas o el consejo (también presión mediática) de quedarse en casa y no hacer vida social también ha condicionado sobremanera a actividades conectadas con el turismo y la existencia de un turismo de proximidad, además de hacer prácticamente inexistente la actividad turística en destinos más lejanos, en caso de haber podido viajar. La distancia social, el evitar aglomeraciones, las limitaciones de aforo, el cierre de atracciones turísticas (incluyendo playas), las restricciones al ocio nocturno o al consumo de alcohol y otras medidas similares han hecho casi inviables muchas actividades culturales y de ocio ligadas al turismo como los eventos, los festivales, los parques temáticos... Finalmente, otra serie de medidas de prevención, de higiene y sanitarias también han ido condicionando y limitando la actividad turística normal (pasaporte COVID o certificados de vacunación, desinfección, geles, mascarillas...). En definitiva, la tormenta perfecta.

En medio de esa tormenta, se esfuerzan por salir airosos e incluso fortalecidos los tres grupos de actores relevantes en la actividad turística: los turistas, los destinos (y sus gestores, normalmente públicos) y las empresas del sector. Cada uno de ellos se está enfrentando a la crisis, a la reacción inicial a la misma y a la futura recuperación con sus propias estrategias. La comprensión de lo que supone el COVID-19 y sus consecuencias para el futuro del turismo debe verse simultáneamente desde esos puntos de vista y considerando las expectativas y los recursos de los diferentes stakeholders (turistas, intermediarios tradicionales como agencias y turoperadores, nuevos intermediarios como las plataformas digitales y las agencias virtuales, empresas de todo tipo proveedoras de los servicios turísticos básicos como alojamiento, restauración o transporte, decisores políticos, gestores de los destinos, empleados del sector turístico o comunidad local) (Sigala 2020). Por otra parte, el impacto del COVID-19 está siendo desigual entre los distintos tipos de stakeholders (incluso positivos para algunos, por el cambio de tendencia hacia lo virtual y digital frente a lo físico y presencial) y también entre los de un mismo tipo, dependiendo de factores tan rígidos como el tamaño o la situación geográfica. Cada tipo de turismo está acusando la pandemia de una forma distinta, con un mejor comportamiento del turismo nacional, de corta distancia y que busca el contacto con la naturaleza (turismo interior, rural, deportivo...) (UNWTO 2022).

Por otro lado, existe la necesidad de que la investigación en turismo reflexione sobre qué ha ocurrido, qué está ocurriendo y qué es deseable que ocurra, en el contexto de la crisis provocada por la COVID-19, pero también de las propias paradojas que ya arrastraba el fenómeno turístico antes de dicha crisis como la sostenibilidad real de la actividad turística, la turistificación y la turismofobia, la precarización de los empleos turísticos, el turismo de bajo coste (y bajos ingresos), etc. El turismo ya es un ámbito científico claramente consolidado y delimitado a pesar de su juventud como actividad social y como objeto de conocimiento. La investigación en turismo está muy condicionada por una doble tradición: por un lado, la llamada Ciencia del Turismo (que se ocupa de los destinos y su planificación y sobre la que giran disciplinas como la geografía, la historia, la sociología, las artes, la antropología o la economía) y, por otro, la Gestión del Turismo (que se ocupa de las organizaciones turísticas y los turistas y que está ligada a campos como el marketing, el management, las operaciones, las finanzas, el transporte o la comunicación) (Benckendorff y Zehrer 2013; Tribe 2010). La unión de ambas tradiciones y su perspectiva interdisciplinar es lo que permitirá que las reflexiones señaladas generen buenas guías para el futuro.

Con este panorama, escribir este capítulo se antoja complicado. Es un fenómeno de dos años de duración, que rompe la tendencia con el pasado y que está sometido a constantes cambios y vaivenes, por lo que la disponibilidad de datos para avanzar en el conocimiento de un fenómeno social de la complejidad del turismo es mínima. Con este horizonte temporal, y a la espera de poder analizar los resultados y las consecuencias de las decisiones tomadas, los análisis empíricos que supongan un avance en el conocimiento están siendo muy limitados (Sharma, Thomas y Paul 2021; Utkarsh y Sigala 2021). El mismo argumento sirve para medir el verdadero alcance de los impactos de la pandemia sobre el turismo, aunque ya existen bastantes estudios, aunque sean parciales (Fotiadis, Polyzos y Huan 2021; Gallego y Font 2021; Kaushal y Srivastava 2021; Jaipuria, Parida y Ray 2021; Skare, Ribeiro y Porada 2021; Ugur y Akbiyik 2020; Yang *et al.* 2021). Otros trabajos se han centrado en la adaptación a la COVID-19 de los distintos stakeholders e industrias del turismo y de los cambios en los hábitos de los turistas (Godovykh, Pizam y Bahja 2021; Qiu *et al.* 2020;

Sánchez-Cañizares *et al.* 2021). Pero la mayoría de la literatura está centrada en las reflexiones sobre cómo salir a corto y medio plazo de la crisis provocada por la pandemia y sobre cómo será el futuro del turismo después de la misma (Assaf y Scuderi 2020; Higgins-Desbiolles 2020; Sharma, Thomas y Paul 2021; Sigala 2020; Utkarsh y Sigala 2021). En esta última línea se va a insertar el enfoque del presente capítulo. La idea es avanzar sobre esta cuestión a partir de la literatura sobre COVID-19 en el campo del turismo.

En estos dos años en los que casi todo el mundo ha hecho un poco de visionario, de zahorí, de adivino, de aprendiz de brujo y de tertuliano tipo maestros liendres no queda mucho espacio para avanzar con paso firme para hacer reflexiones valiosas y basadas en el conocimiento asentado sobre el presente y el futuro del turismo a partir de la COVID-19. A pesar de ello, este capítulo busca profundizar en algunos de los debates y de las inquietudes que se han vivido en el ámbito del turismo durante la pandemia, de forma que se pueda mantener un diálogo productivo sobre algunas cuestiones que parecen especialmente relevantes y que están contenidas en cada uno de los apartados que siguen: la salud y la seguridad en el turismo, la cooperación y la colaboración entre stakeholders, el papel de lo público, el equilibrio entre un enfoque global y otro local de la actividad turística y el posible cambio de paradigma turístico como consecuencia de la COVID-19.

1. ECONOMÍA VS. SALUD

Probablemente este haya sido el gran debate, casi por encima de los temas puramente sanitarios y epidemiológicos: o economía o salud. Esta cuestión, por decirlo de alguna forma, ha contagiado también y de una forma intensa a la actividad turística.

Las autoridades políticas y sanitarias han estado desde el comienzo de la pandemia haciendo planteamientos diversos, a veces con criterios técnicos y a veces con criterios ideológicos, sobre la necesidad de hacer un intercambio entre salud y economía. Si se quería evitar el contagio había que limitar las actividades económicas y sociales y eso generaba una contracción de la economía que era considerada muy perjudicial por determinados decisores. Si se optaba por mantener la actividad económica en cierto grado, la pandemia se expandía con la consiguiente presión en el sistema hospitalario y sus costes derivados, siendo un gran número de muertes el más importante. En ningún lugar del mundo se ha optado de manera tajante por una u otra alternativa y se han ido estableciendo pesos cambiantes para cada uno de estos dos elementos en liza dependiendo del momento, de la evolución de la pandemia en cada lugar y, probablemente, de motivaciones ajenas a la adecuada gestión global de la crisis provocada por la COVID-19.

En el ámbito turístico, debido a las consecuencias que la mayoría de las medidas sanitarias han tenido en sus actividades (con el viaje como eje central, como ya se ha apuntado), este debate ha sido seguido con especial detenimiento (Razak 2020).

Arbulú y otros (2021) proponen un esquema para analizar las relaciones de intercambio entre las dos posibles estrategias enfrentadas para hacer frente a la crisis de la pandemia: poner por delante la catástrofe social y económica derivada de políticas destinadas a la contención de la pandemia, con lo que se asume que puede haber un número alto de muertes, frente a desarrollar medidas de contención suficientes para que el sistema sanitario no colapse, con lo que se asume que se producirán efectos económicos y sociales adversos. Los autores analizan las consecuencias económicas de las medidas de contención de la pandemia desde el lado de la oferta (ruptura de la cadena de suministros, con China como elemento central, contracción del comercio internacional o disminución de la fuerza de trabajo por enfermedad, cuarentenas, confinamiento o limitaciones a la movilidad) y también desde el lado de la demanda (caída del consumo derivada de unos menores ingresos por los motivos anteriores o directamente pérdida de empleos, caída de las exportaciones, menores inversiones, problemas de solvencia y liquidez o problemas de crédito por debilidad del sistema financiero). Las medidas de política económica (fiscales, monetarias, laborales o de soporte a determinados sectores) pueden mitigar los efectos de las políticas de contención de la pandemia. Se señala que el sector turístico (y particularmente algunos de sus subsectores) son los que de forma más acusada sufren las consecuencias de las medidas para limitar los contagios y sus consecuencias y que, por tanto, es necesario intensificar las medidas económicas de apoyo a este sector. Volveremos a esta cuestión más adelante.

Sin embargo, es relevante comprender que, de nuevo por las particularidades del turismo, este sector se ha visto sometido a una dosis adicional de escrutinio sobre los aspectos de salud e higiene, con lo que ha tenido que dar una respuesta aumentada para procurar la reactivación de la industria. Antes de entrar en las medidas que concretan esa respuesta, la intensidad con la que se ha abordado esta cuestión en el turismo lleva a caracterizar a esta actividad económica como una de en las que más cuentan todos los factores que tienen que ver con la seguridad y la salud. En el ámbito profesional y en el ámbito académico del turismo este fue el primer gran tema que alimentó la conversación.

Las medidas iniciales para reactivar el sector turístico ofreciendo ciertas garantías para el turista fueron

básicamente las que obligaban las autoridades en cada momento y en cada lugar y otras tendentes a generar una situación de seguridad y certidumbre que permitiese la recuperación del sector y, por tanto, compensando otras del tipo de la distancia social, las campañas para quedarse en casa o la búsqueda de las experiencias virtuales (Assaf y Scuderi 2020; Sigala 2020).

En general, las medidas implementadas en las distintas industrias turísticas se han basado en actividades adicionales relacionadas con la higiene y la limpieza, en la búsqueda activa de la distancia social, en protocolos promovidos por asociaciones o por las propias empresas y en la existencia de certificaciones que garantizasen públicamente las medidas adoptadas.

El foco principal se centró en un principio en las cuestiones de limpieza e higiene (algo normal debido a la gran incertidumbre respecto a las vías de transmisión del virus). En particular, los nuevos protocolos de limpieza que abarcaban todas las superficies (con mayor intensidad en aquellas en que se producían un contacto con más personas), el uso de desinfectantes, la compra de máquinas de ozono... Y, desde el otro lado, la solicitud de medidas que debe tomar el turista para no extender el contagio durante su viaje: uso de mascarilla, toma de temperatura, seguimiento de las medidas higiénicas, vacunación, pruebas de diagnóstico antes de volar, certificados covid...

Las prácticas de distancia social también fueron muy relevantes en la mayor parte de los sectores turísticos incluyendo la limitación de aforo (por decisión propia o por obligación) y la gestión de multitudes, el uso de separadores físicos, la preferencia por actividades al aire libre si era posible en el establecimiento, el empleo de tarjetas de crédito, la virtualización de procedimientos en varios tipos de empresas turísticas, como los de check-in y check-out, el uso de robots y de chatbots para la atención a los clientes, el uso de apps específicas para un gran número de acciones, el cambio en las operaciones habituales, como el cierre de los bufés en los hoteles, el empleo de códigos QR para mostrar cartas o hacer pedidos, etc.

El proceso es posible que continúe con las nuevas evidencias y certidumbres sobre la transmisión del virus de forma que, a medio plazo, se establezcan medidas para el control del aire en el interior de los establecimientos, se rediseñen los espacios en hoteles y restaurantes para generar una mayor distancia física y social, se tienda a la automatización de un mayor número de procesos para limitar el contacto humano, se promueva el uso más intensivo de las nuevas tecnologías, etc. Sin embargo, la mayoría de estas medidas que buscan generar en el turista/cliente una sensación de seguridad derivada de la distancia social y el cambio de la atención humana por una atención virtual tendrán como contrapartida la pérdida de parte de la experiencia turística, que en gran medida es un servicio ofrecido por personas.

La sensibilidad del turista a las cuestiones sanitarias y especialmente a la situación provocada por la COVID-19 se mostró en que, independientemente de las restricciones a la movilidad y a la actividad económica, los propios consumidores, en una actividad que presentan un cierto grado de planificación previa, optaron desde un primer momento por las cancelaciones de sus viajes (Ugur y Akbiyik 2020). Otros análisis muestran la importancia que los turistas dan a este tipo de cuestiones o sus consecuencias (Razak 2020). Por ejemplo, según un estudio de Inmarsat (2021), el factor fundamental que condiciona la elección de los pasajeros es la limpieza de la cabina, con un 71 % de respuesta entre los entrevistados. También señala que las principales preocupaciones de los viajeros son contagiarse del virus en el avión o en el aeropuerto y el riesgo de tener que pasar cuarentenas. En los trabajos que muestran los cambios en la intención de compra de los turistas tras la COVID-19, la preocupación por la salud y la seguridad también aparecen de forma destacada (Golets *et al.* 2021; Sánchez-Cañizares *et al.* 2021).

Sin embargo, en la mayoría de los trabajos que han planteado la cuestión de la necesidad de limitar los riesgos para la salud como condición previa a la recuperación de la actividad turística, se habla principalmente de la percepción de esa seguridad (Golets *et al.* 2021; Sánchez-Cañizares *et al.* 2021; Sigala 2000). La evolución de la actividad turística durante estos dos años también parece corroborar este patrón. En aquellos entornos que se consideraban seguros desde el punto de vista sanitario como los exteriores o la naturaleza, el turismo se ha recuperado rápidamente e incluso ha crecido frente a momentos anteriores a la pandemia. Esto ocurrió incluso cuando todavía los mecanismos de transmisión del virus no estaban tan claros como en estos momentos. Por tanto, la sensación de seguridad está en la base de las decisiones de compra de los turistas y es un elemento esencial en la recuperación de la actividad. Aunque ya se ha ido avanzando durante la pandemia, mostrando públicamente protocolos, sellos y garantías de «espacios libres de COVID», no cabe duda de que el futuro pasa por generar por parte de empresas y destinos esa percepción de seguridad para el turista. Generar esa imagen no solo será una cuestión de márketing, sino que implicará a todas las áreas operativas de las organizaciones turísticas.

En todo caso, las cuestiones ligadas con la seguridad, incluyendo la perspectiva sanitaria y de salud, se ha señalado como una condición sine qua non para el desarrollo de los destinos turísticos desde hace años (Liu y Gao 2008). Por tanto, una parte muy importante para el correcto funcionamiento de los destinos turísticos y de las empresas que habitan en el mismo, será cada vez más la

imagen de contar con un sistema sanitario sólido y accesible, de forma que el turista no vea peligrar en destino las seguridades que tiene en su lugar de origen. Esta idea se extiende a otros campos relacionados como la seguridad ciudadana o la estabilidad política. En conjunto, los poderes públicos y los gestores de los destinos deben promover políticas más allá de las propias del sector turístico como elementos clave para el desarrollo de esta actividad. La pandemia ha aportado nuevas evidencias de que cuando esto ocurre la demanda de un destino (o tipo de turismo) se acrecienta por sí misma.

Y este proceso lógico parece responder a la pregunta original de este apartado: ¿está antes la economía o la salud? Al menos en el ámbito del turismo, la recuperación (obviamente una vez levantadas las restricciones) se ha ido produciendo en aquellas zonas, en aquellos países, en aquellos destinos, en aquellas modalidades de turismo, en aquellas actividades turísticas o en aquellas empresas turísticas en las que la sensación de que la pandemia estaba remitiendo o los problemas de salud eran menores (o contaban con un sistema sanitario capaz de hacer frente a una eventualidad). Las distintas olas de la pandemia, con sus diferencias regionales y locales, han anticipado con su bajada la reactivación de la economía ligada al turismo. Las subidas de esas olas han traído cancelaciones y la vuelta a una recesión en el sector. Quizá estos movimientos hayan sido más inmediatos en el sector turístico, pero probablemente hayan jugado en el mismo sentido en algunos otros sectores económicos. Con la perspectiva de dos años, parece correcto afirmar que cuanto más se ha apostado por la salud, más ha acabado fortalecida la economía. Y además se han evitado muertes, enfermedades, ingentes gastos sanitarios y secuelas físicas y psicológicas en la población. Tal como pronosticaron los expertos del sector, el turismo no iba a ser lo que era sin una vacunación universal y la sensación de seguridad que iba a generar. Todavía no se ha cubierto del todo y esto implica riesgos adicionales para el futuro.

2. LA MANO INVISIBLE VS. LA MANO VISIBLE

Desde mediados de los ochenta tanto en la teoría como en la práctica económica el neoliberalismo ha sido claramente la corriente dominante y las decisiones políticas y de gestión empresarial han estado presididas por dicha lógica, que algunos han formulado como «pensamiento único». La idea de la mano invisible del mercado de Adam Smith como organizador automático de la actividad económica ha sido ampliamente aceptada.

Curiosamente la actividad turística ha sido una de las más beneficiadas de esta concepción de la economía, ya que ha derivado en procesos de liberalización de las restricciones nacionales y de movimiento (como los acuerdos de cielos abiertos que han permitido un gran crecimiento del tráfico aéreo), la globalización como forma de entender no solo la economía sino también la sociedad (quizás aquí el turismo ha contribuido después a la homogeneización de culturas, costumbres y hábitos de compra), la especialización regional (con zonas emisoras y receptoras de turismo y con la segmentación de la actividad turística) y la conexión de la actividad turística con la expansión económica y financiera. Probablemente sin esta ideología económica la expansión del turismo de masas en estas últimas décadas hubiera sido otra cosa.

Ese dejar hacer económico ha permitido la proliferación de empresas en el turismo (que además se ha expandido a otras actividades y servicios afines y complementarios), el crecimiento de las mismas (muchas veces por procesos de integración a través de fusiones y absorciones), la apuesta más generalizada por una disminución de costes (que en última instancia ha llevado a la aparición de una nueva tipología turística, que se ha mostrado masiva, ligada al turismo de bajo coste, con amplias consecuencias que se están volviendo contra la propia actividad turística), el aprovechamiento de las zonas no reguladas para reconfigurar totalmente el sector (que ha pasado de una estructura tradicional basada en dos escalones clásicos de intermediación, el mayorista con los turoperadores y el minorista con las agencias de viajes, a otra con una nueva intermediación basada en plataformas virtuales y a lo que algunos se refieren incorrectamente como economía colaborativa) o el cambio en muchos sectores de una gestión basada en el servicio y que busca la diferenciación a otra de corte más industrializado y que busca la estandarización.

Por estas y otras razones que escapan al contenido lógico de este capítulo, el turismo que conocemos en los últimos tiempos está muy ligado a la concepción económica neoliberal. Quizás por el relajamiento en cuanto a los límites económicos que ésta preconiza están surgiendo líneas de contestación sociales, políticas y académicas que empiezan a señalar los límites del turismo tal como está concebido en la actualidad y que buscan la sostenibilidad económica, laboral, social y medioambiental de este importante sector. Aunque son más visibles algunos fenómenos como la turismofobia, la preocupación por la turistificación o la pérdida o degradación de los recursos turísticos (sean naturales o patrimoniales), también existe una corriente creciente que apunta a la necesidad de un papel mucho más activo del sector público en la actividad turística.

Este papel del gobierno (en sus distintos niveles) ha sido bien considerado, incluso por el empresariado y los decisores políticos más cercanos a las posturas neoliberales, en un ámbito concreto, pero muy importante, del

turismo: la gestión de los destinos turísticos. Existe un consenso claro en que el liderazgo de los distintos stakeholders que componen el entramado de un destino turístico (proveedores de servicios turísticos de alojamiento, restauración, culturales, ocio, guías, actividades deportivas y recreativas, etc., agencias de viaje principalmente receptivas, turoperadores que crean la oferta del destino, gestores de aeropuertos y otros hubs de comunicación, administraciones públicas de distinta naturaleza y sociedad civil) debe ser ejercido por los gestores públicos de cada destino. Aunque sí es común que estos decisores públicos estén aconsejados por algún tipo de estructura que incluya la representación de dichos *stakeholders*.

Aparte de este ámbito, la presión de las empresas turísticas ha ido siempre por el lado de la autorregulación (normalmente más laxa y difícil de controlar) que por mostrar la predisposición a la regulación (que en un buen número de casos también les beneficia). Y siempre queda para todo ese ámbito empresarial tan apegado a ese liberalismo económico, pedir ayudas o regulación públicas cuando o no les van bien las cosas o sencillamente no se están cumpliendo sus expectativas.

En este contexto y teniendo en cuenta que la mayoría de las economías occidentales han contado con una cierta tradición keynesiana, lo público, lejos de haber desaparecido, ha jugado un papel relevante para que el crecimiento del turismo se diera dentro de las fronteras de lo lógico y lo aceptable por los distintos actores.

Sin embargo, la pandemia provocada por la COVID-19 ha vuelto a poner de manifiesto el papel de lo público en la actividad económica y empresarial. De nuevo, y más allá del discurso, las posturas mantenidas han sido variadas. Pero, en particular en nuestro país, que es una potencia turística a nivel mundial (en casi todos los indicadores importantes entre las cinco primeras posiciones), el papel de las administraciones públicas para contener la pérdida de empleos y de empresas en el turismo y para promover un despegue del mismo conforme las condiciones sanitarias lo han ido permitiendo ha sido destacado y, quizás, determinante. La mano visible que ha intentado gobernar y mejorar los mercados está actuando y parece que con éxito.

En concreto, el papel que las administraciones públicas han jugado en la contención de las consecuencias de la pandemia en el sector turístico en España ha sido muy importante. El elemento más relevante para el mantenimiento del sector, del empleo y de la competitividad futura ha sido el intenso y extenso uso que el turismo ha hecho de los Expedientes Temporales de Regulación de Empleo (ERTE) ligados a la pandemia que el Gobierno ha negociado en sucesivas ocasiones con los agentes sociales. Este mecanismo, además del mantenimiento del empleo y de las rentas con consecuencias también positivas desde el lado de la demanda, ha dotado a las empresas del sector de un colchón respecto a sus costes, a la programación de sus operaciones y a la gestión de sus recursos humanos que les ha dado la suficiente flexibilidad para ir adaptándose a las situaciones cambiantes que se han vivido. Además, el sector de las agencias de viajes será el primero en probar el mecanismo de ERTE sectorial recogido en la reforma laboral.

Desde el nivel del Gobierno nacional no han sido las únicas acciones que han permitido mantener vivo al sector turístico y a sus empresas y también prepararlas y empujarlas para la recuperación posterior. Entre otras acciones adicionales están la línea de avales del Instituto de Crédito Oficial (ICO), las ayudas a empleados autónomos que suponen una parte importante del empresariado turístico, el Plan de Modernización y Competitividad del sector turístico, con una inversión pública estimada de 3.400 millones de euros en tres años, otras acciones del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia, las ayudas para la digitalización de las empresas turísticas, el Fondo de Apoyo a la Solvencia de Empresas Estratégicas (que se está estudiando para empresas como Room Mate, Hesperia, Air Nostrum o eDreams) o la participación de la industria turística en diversos proyectos y líneas de actuación ligadas a los fondos Next Generation. A nivel autonómico y local las ayudas e incentivos van desde el Plan de Ayudas Directas para el sector gestionado por las Comunidades Autónomas hasta los bonos turísticos ideados para fomentar un determinado destino o región.

A nivel académico también se ha planteado la necesidad de profundizar en la actuación pública para alcanzar la recuperación del turismo después de la pandemia (Assaf y Scuderi 2020; Sharma, Thomas y Paul 2021; Sigala 2020). Los autores señalan medidas de contención de las consecuencias de la caída de la actividad por el cierre de los negocios o por la inexistencia o bajada extrema de la actividad turística como subvenciones directas o indirectas, la promoción intensa de los destinos (incluyendo los bonos que ofrecen los destinos locales o regionales), la permisividad con la entrada de turistas, etc., pero también otras medidas a medio y largo plazo tendentes a la recuperación completa de la actividad o incluso de la reestructuración de la propia lógica del turismo con la vista puesta en la sostenibilidad y la innovación. Esto incluye también la viabilidad económica de las empresas del país como la protección ante la adquisición de empresas turísticas relevantes por parte de inversores predadores (como está ocurriendo con el deseo de los fondos de inversión inmobiliarios de activos hoteleros de lujo en España o con el riesgo de que grandes empresas del sector como alguna aerolínea acabe en manos extranjeras).

3. INDIVIDUALISMO VS. COOPERACIÓN

La antes referida lógica neoliberal parte de una concepción individualista de la sociedad y de la economía. Las empresas y los consumidores actúan, según estos economistas, de forma individual, independiente y egoísta, intentando maximizar su propio interés y satisfacer sus propias necesidades. La confluencia de todos esos intereses individuales en el mercado permitiría el mejor ajuste para todos, de forma que se maximizaran los beneficios.

Aunque la mano invisible parece que no maneja la situación de la misma forma para todos, ese aprecio por el individualismo y el egoísmo se ha ido extendiendo por los distintos ámbitos sociales y es un esquema generalizado de pensamiento en la mayoría de las sociedades. En el ámbito empresarial esta idea se centra en la concepción de la competencia y de sus fuentes y en la búsqueda de la competitividad de cada organización como clave del éxito (sea la supervivencia o la maximización de los beneficios).

Sin embargo, tanto en la realidad empresarial como en el conocimiento científico de la organización de empresas, particularmente en el ámbito de la gestión estratégica, la cooperación entre organizaciones (y también entre los miembros de esas organizaciones) se ha reconocido como un elemento central para ser competitivos y obtener el éxito. La lógica de la cooperación supone superar (o al menos orillar) la propia del individualismo y la competición de todos contra todos, propia del mercado ideal de los pensadores neoliberales.

En el ámbito del turismo esta lógica de la cooperación entre organizaciones turísticas, que puede darse entre empresas privadas y organizaciones públicas, pero también entre empresas a distinto nivel (con menor presión competitiva entre ellas en ese caso) y en un mismo nivel (la cooperación entre rivales directos), está en la base de la actividad turística tal y como la conocemos en los últimos años.

Este fenómeno abarca prácticamente a todos los sectores del turismo en mayor o menor medida. En cada sector, las formas preponderantes de esta cooperación empresarial presentan formas distintas: acuerdos de código compartido y grandes alianzas en el caso de las aerolíneas, franquicias en la restauración, cadenas en el ámbito hotelero, cadenas de subcontratación en los turoperadores o redes centralizadas en el caso de las plataformas virtuales de intermediación en la actualidad.

Es cierto que en todos los casos mencionados existe una combinación de competencia y cooperación entre los actores que conforman esos acuerdos y redes y que es difícil encontrar posturas totalmente altruistas, pero no es menos cierto que las empresas implicadas en estos procesos han renunciado a tomar decisiones individuales y han apostado por poner recursos en común en otras entidades diferentes a la propia empresa y han aceptado algún tipo de estrategia colectiva como forma de competir: de llegar a los mercados, de buscar nuevos clientes, de enfrentarse a sus rivales, de convertirse en líderes, etc. Dentro de los destinos turísticos se dan distintas formas de cooperación entre sus gestores y los distintos agentes implicados (Baggio 2011).

El caso de las aerolíneas es paradigmático. El crecimiento de las rutas aéreas y el tráfico en los últimos 25 años está claramente ligado a la aparición de las tres grandes alianzas del sector (Oneworld, Skyteam y Star Alliance) entre 1998 y 2000 y a la proliferación de acuerdos de código compartido entre las aerolíneas, principalmente dentro de la propia alianza, que permiten que un pasajero realice parte de su trayecto en un avión de una compañía distinta a la que le vendió el vuelo. Esto ha permitido conectar el mundo a través de unas avenidas principales y una gran capilaridad, de tal forma que cualquier persona de cualquier parte del mundo pueda viajar a cualquier otro sitio habiendo comprado un solo billete y sin tener que preocuparse de su equipaje hasta llegar al destino, además de tener otros servicios comunes. Se puede volar a cualquier parte del mundo, pero dentro de cada una de esas tres grandes alianzas, salvo casos menos habituales. Eso ha permitido incrementar extraordinariamente el tráfico aéreo (otra importante parte de este incremento se debe a la proliferación a las compañías de bajo coste que trabajan con una operativa diametralmente opuesta a las grandes compañías que operan a nivel internacional) y, como consecuencia, provocar un incremento de la actividad turística, sobre todo, hacia destinos lejanos. Esta cooperación entre aerolíneas ha significado la conexión entre rutas, la apertura de otras nuevas, el incremento de tráfico, la disminución de los costes de las operaciones, el incremento de la ocupación en cada vuelo, la disminución de la huella de carbono al optimizar los vuelos programados o una política de imagen y de fidelización más acentuada. En un sector muy concentrado con unas 150 empresas relevantes a nivel mundial, este fenómeno cooperativo no parece encajar con una lógica más competitiva. Es cierto que también tiene causas propias, como las limitaciones a los procesos de integración y fusiones entre compañías (que es una forma mucho más acusada de limitar la competencia en los mercados) (Casanueva *et al.* 2012; Castiglioni, Gallego y Galán 2018).

Esas mismas conexiones aéreas fueron las primeras afectadas con la pandemia por distintos motivos: limitaciones en los vuelos provenientes de determinadas regiones (con alta incidencia del virus u origen de nuevas variedades del mismo), impedimentos a la movilidad nacional e internacional, restricciones a los pasajeros en

forma de controles y necesidad de certificados, etc. El resultado fue multitud de vuelos cancelados y de rutas perdidas. La operativa en forma de red o de punto a punto de las compañías también ha facilitado o no el ajuste en estas empresas, pero muchas de ellas han tenido que seguir operando agrupando rutas o frecuencias de vuelo, incluso a través de «vuelos fantasma», que operan con resultados negativos para mantener los derecho de vuelo (*slots*). La consecuencia es una mayor limitación para viajar debido a la disminución de los vuelos programados y un importante deterioro financiero para estas empresas, que ven peligrar en muchos casos su supervivencia. En algunos países, después de las dudas impuestas por propuestas económicas anteriores y a pesar de las normativas de defensa de la competencia, han optado por un apoyo financiero sin precedentes en años recientes a las aerolíneas.

Sin embargo, la cooperación entre esas empresas, en principio rivales directos, también supondrá una salida a la crisis provocada por la pandemia más rápida y barata que la que se podría esperar si cada empresa decidiera y actuara por su cuenta. La recuperación del tráfico aéreo en un entorno en el que los acuerdos de cooperación son algo habitual y en el que se comparten entre rivales los costes de mantener una red global para ofrecer a los turistas, hará que la incorporación paulatina de nueva oferta de vuelos, frecuencias y rutas se realice de forma más natural. De hecho, las operaciones del tráfico internacional están poco a poco volviendo a la normalidad a pesar de que la presión del turismo internacional todavía no es muy fuerte. De nuevo, esa mayor oferta de movilidad y conectividad estará en la base de la recuperación del turismo.

En otros sectores turísticos este fenómeno también se da, pero de forma menos intensa, como en el caso de las franquicias y de las cadenas, debido a que conforman redes de cooperación más centralizadas y, por tanto, la vuelta a la actividad normal está muy vinculada a la empresa o a las empresas que conforman el centro de la red. Lo mismo cabe decir en cuanto a las plataformas virtuales. En todo caso, la existencia de estas formas de cooperación, aunque sean centralizadas, ha servido para que empresas de menor dimensión y capacidad financiera en los distintos subsectores del turismo (pequeños franquiciados, dueños de hoteles adscritos a cadenas, empresarios que ponen en el mercado sus productos y servicios turísticos a través de las plataformas virtuales, entre otros) puedan sobrevivir y que se adapten con mayor flexibilidad a una situación de recuperación de la actividad turística que está sometida al doble juego de la estacionalidad y de las fluctuaciones provocadas por las sucesivas olas de crisis sanitarias propias de esta pandemia.

En el ámbito académico del turismo también se ha planteado de forma explícita la necesidad de que los distintos actores muestren un amplio grado de cooperación tanto para salir de la crisis como para generar un sector turístico distinto y más sostenible en el futuro, especialmente en el ámbito de los destinos turísticos (Higgins-Desbiolles 2020; McCartney 2021; Sigala 2020; Utkarsh y Sigala 2021).

4. GLOBAL VS. LOCAL

La internacionalización y la globalización son dos de las grandes tendencias que han afectado a las organizaciones turísticas en las últimas décadas. A nivel empresarial supone que cualquier empresa turística debe considerar que compite con cualquiera de cualquier parte del mundo, ya que los turistas van a elegir entre destinos, y entre las empresas proveedoras de servicios dentro de esos destinos turísticos, a nivel global. En cada opción de compra de un viaje el turista se plantea sus elecciones con esta perspectiva. Pero además cualquier empresa del mundo puede empezar a operar en un destino cualquiera por muy recóndito y poco conocido que sea, ya sea gracias a la tendencia a la virtualización de las actividades o a fenómenos de crecimiento empresarial modernos como las franquicias y otros tipos de redes.

A esta tendencia han contribuido la globalización en casi todos los sectores de la economía y la uniformidad cada vez mayor en los usos y costumbres, en los hábitos de consumo, en las referencias culturales y en las formas de hacer turismo. Obviamente la disminución de las barreras nacionales para la movilidad y el alto grado de interconectividad en el transporte han acelerado el proceso. La movilidad internacional de capitales, personas, información y desarrollos tecnológicos ha hecho que el turismo sea una industria global desde hace años.

De forma paralela y por las mismas razones antes apuntadas, la tendencia de una parte importante de las empresas turísticas de mayor dimensión (aunque también muchas pequeñas creadas como «born globals») es a competir en mercados internacionales, es decir, no limitar sus actividades operativas y/o comerciales a sus mercados locales o nacionales.

A nivel macro, uno de los indicadores más importantes de la actividad turística es la llegada de turismo exterior, otra perspectiva de la internacionalización. Este dato es importante además por la contribución del turismo a la balanza de pagos y a otras magnitudes económicas relevantes. Además, se trata de un turismo que genera un número mayor de pernoctaciones y tiene un gasto medio diario más elevado (UNWTO 2022).

A pesar de esta tendencia hacia la globalización, el turismo es una de las industrias más centradas en lo local.

Esto se debe a que buena parte de la actividad turística está basada en unos recursos naturales, patrimoniales, culturales, folclóricos, etc. que no son móviles. Es el turista el que se tiene que desplazar hasta los enclaves geográficos donde se encuentran los recursos y las empresas intentan instalarse lo más cerca posible de los mismos para resultar atractivas a los turistas. Incluso cuando la propia empresa es el recurso turístico (por ejemplo, un parque de atracciones) este planteamiento local sigue siendo central.

Con la crisis provocada por la pandemia el turismo internacional cae brutalmente y casi desaparece en algunas zonas con mayor incidencia (UNWTO 2022). La estructura global que conocíamos del turismo va perdiendo su sentido. Sin embargo, conforme los indicadores sanitarios van mejorando, se produce una rápida recuperación de la actividad turística internacional, aunque muy lejos de los niveles de 2019. Sin embargo, la tendencia más consistente en el proceso de recuperación del turismo después de las primeras olas de la pandemia es el auge del turismo nacional. Este fenómeno es claramente explicable por un conjunto de factores que generan efectos sinérgicos: el cierre de las fronteras nacionales, la menor oferta de conectividad internacional, las limitaciones y restricciones en aeropuertos y aviones, las políticas activas de fomento del turismo nacional por parte de las autoridades nacionales, regionales y locales y la percepción de seguridad general (y específicamente sanitaria) de los nacionales. Esto ocurre en los principales mercados emisores de turistas, que también cuentan con una amplia capacidad receptiva (Sharma, Thomas y Paul 2021). Obviamente se produce un gran cambio en las modalidades de turismo predominantes. Todo el turismo ligado a actividades en la naturaleza, turismo deportivo, turismo rural, turismo cultural y patrimonial se muestran como categorías más estables e incluso experimentan un incremento respecto a niveles anteriores a la pandemia (Huang *et al.* 2021).

En España, la pérdida de turismo extranjero, sobre todo de los mercados británico y alemán que buscan el sol y playa, se vio compensado por el incremento del turismo nacional en buena parte de las regiones (incluyendo también las zonas costeras). El resultado global fue el mantenimiento de la actividad turística y la supervivencia de muchas empresas del sector en un momento de importante crisis. Sin embargo, esta capacidad de resiliencia fue mayor en las zonas interiores y menor en las principales regiones turísticas, que son las que reciben fundamentalmente el turismo exterior (Baleares, Canarias, Andalucía, Cataluña, Comunidad Valenciana y Madrid). Con metodologías distintas estas cuestiones han sido puestas de relieve por diferentes investigaciones (Arbulú *et al.* 2021; Duro *et al.* 2021).

En un contexto de ruptura de los sistemas de valor globales, de interrupción de la cadena de suministro y de limitaciones en la conectividad, la vista se vuelve hacia el turismo de proximidad como alternativa al modelo turístico dominante. Esta idea viene acompañada de una mayor conciencia del turista respecto a la sostenibilidad de sus propias acciones. La consideración de la huella de carbono de las distintas actividades del turismo, pero principalmente ligadas al transporte (en particular, del transporte aéreo), y de todas las cuestiones que tienen que ver con la masificación del turismo y el control de la capacidad de carga de algunos destinos y de algunas atracciones dentro de los mismos que pueden generar un impacto negativo en la experiencia turística, están haciendo que un número cada vez mayor de responsables políticos, de académicos y, sobre todo, de turistas, estén apostando por un turismo de corto radio, con una puesta en valor de los recursos naturales, patrimoniales, culturales o gastronómicos y de la comunidad local y por un cambio en la experiencia turística (Higgins-Desbiolles 2020; Sharma, Thomas y Paul 2021; Sigala 2020). En definitiva, se estaba produciendo un cambio en estos años en el turismo que apuntaba más hacia lo local que hacia lo global. Este cambio se ha hecho necesariamente más acusado durante la pandemia y puede que del mismo surja un redescubrimiento de los movimientos de turistas hacia lugares cercanos, seguros, controlables y más conocidos, frente a la búsqueda de paraísos lejanos, inciertos y desconocidos que eran la aparente última frontera deseada por el turista (UNWTO 2022).

Para las empresas turísticas y los gestores de destinos este cambio supone en cierta medida una amenaza a corto plazo, pero, sin duda, una gran oportunidad a medio y largo plazo. La adaptación (más allá del puro marketing y lavado de imagen) que supone un cambio hacia la sostenibilidad de las empresas y de los destinos, y una nueva concepción en la forma de viajar, harán que «los nuevos turistas» cambien su experiencia hacia otras más cercanas al «slow tourism» o a distintas formas de disfrutar el ocio fuera del lugar de residencia. Estos cambios probablemente incrementen tanto el tiempo de estancia como el nivel de gasto. Desde el punto de vista de los destinos, volver a centrarse en el ciudadano a un nivel similar que en el turista en las zonas más saturadas, incorporar la filosofía y las innovaciones del turismo inteligente o la búsqueda del turista más próximo (aunque también otras formas de turismo no masivo basado en algunos segmentos o en cierto grado de especialización como el turismo basado en series y películas, en experiencias inmersivas o en actividades a la carta), tendrán efectos combinados en la sostenibilidad y en la rentabilidad de las empresas turísticas. Probablemente los grandes viajes serán menos habituales y numerosos, más

caros y más a medida que antes de la pandemia. Y las causas combinarán los cambios en la oferta (empresas proveedoras de servicios turísticos y gestores de destinos) y de demanda (con una mayor concienciación de los turistas y el cambio en sus gustos y preferencias) (Golets *et al.* 2021; Huang *et al.* 2021).

5. INERCIA VS. CAMBIO. EL FUTURO ESTÁ EN JUEGO

De lo que no hay dudas en el sector turístico es que en estos dos años tanto en el ámbito académico como en el profesional y empresarial no se ha dejado de hablar de que hay que repensar el turismo. Aunque la pandemia haya servido también como catarsis, crisis o proceso de reflexión en otros sectores y áreas del saber, el consenso suscitado en torno a que de la pandemia tiene que salir un turismo distinto es innegable. Esta impresión generalizada se debería al convencimiento de que estábamos ante un modelo agotado a pesar de que seguía creciendo. La ruptura de esa tendencia creciente, llevando la actividad turística a niveles próximos a cero en algunas zonas y momentos, ha obligado a replantear la idea misma de crecimiento como indicador válido del éxito en el turismo. Era un debate en ciernes, pero hoy se ha convertido en el gran debate.

Una de las académicas más reputadas en el ámbito del turismo, Marianna Sigala, llega a preguntarse por la propia esencia del turismo. «¿Por qué el turismo es visto, practicado y gestionado como una forma de "evasión", de "relax", de "socializar", de "construir identidades o de generar estatus", de "aprender" y compensarnos por una vida rutinaria, falta de satisfacciones y carente de sentido? ¿Por qué el turismo debe ser investigado y practicado como una vía de escape de una vida aburrida, en lugar de buscar que la vida sea gratificante y significativa en sí misma? ¿Por qué la gente tiene que viajar miles de millas lejos de casa para "aprender" y para "ser feliz"?» (Sigala 2020: 314). La propia autora señala que este tipo de visiones y paradigmas han amplificado la crisis de la COVID-19 en el turismo y que se hace necesario una reformulación filosófica y psicológica de la actividad turística que vaya más allá del consumismo turístico para alcanzar la felicidad, la autoexpresión y el desarrollo económico. Ella propone resetear y reimaginar el turismo como lo conocemos hasta ahora y hacerlo tanto a nivel de la investigación como a nivel de la práctica (cómo se hace turismo –demanda– y cómo se prestan los servicios turísticos –oferta–). La noción del reseteo de los planteamientos tradicionales del turismo y la búsqueda da la recuperación postcovid con nuevas bases es común en otros autores (Hall, Scott y Gössling 2020; Higgins-Desbiolles 2020).

La idea de empezar de cero o de haber tocado fondo invita a que, puesto que debemos marcar una senda de crecimiento con total seguridad, esa senda sea ahora lo más recta y satisfactoria posible. Siguiendo el símil, esto va a estar condicionado por la orografía del terreno (el entorno económico, social y político que rodea al turismo) y por la inercia derivada de otras cuestiones como la trayectoria anterior o la aceleración provocada por factores como la gravedad (va a ser muy difícil que los modelos turísticos anteriores que estaban resultando exitosos y/o generaban beneficios estén motivados para cambiar su forma de actuar).

Con las limitaciones apuntadas, la búsqueda de esos nuevos caminos de futuro debe basarse en lo que hemos ido aprendiendo. Antes de la pandemia ya se había configurado un extenso catálogo de temas que ponían en entredicho la lógica dominante sobre el desarrollo económico y social que suponía el turismo (Higgins-Desbiolles 2020; Sigala 2020). Ya se ha comentado antes la gran presencia que en la literatura y en la investigación científica en turismo (pero también en los foros empresariales y profesionales) han tenido en los últimos años cuestiones como la sostenibilidad, la capacidad de carga de destinos y atracciones, la implicación de las comunidades locales, etc.

Dos grupos de ideas reordenan el pensamiento sobre el futuro del turismo. En primer lugar, aquellas cuestiones que apuntan hacia un nuevo de modelo de crecimiento turístico (aunque hay quien insiste en reproducir el modelo actual) y, en segundo lugar, otras que apuntan hacia la sostenibilidad (Hall, Scott y Gössling 2020; Ioannides y Gyimothy 2020; Sharma, Thomas y Paul 2021). De algunas de estas cuestiones ya se ha tratado en apartados anteriores y hacer un repertorio de ellas sería muy prolijo debido a la amplitud de sus perspectivas (que van desde las más tradicionales hasta las que buscan acabar con el modelo neoliberal de producción y consumo turístico, pasando por las que apuestan por una mayor vigilancia del modelo capitalista), de las temáticas consideradas (influencia de los datos en el comportamiento humano y las decisiones de compra turísticas, robotización y digitalización de las operaciones, problemas éticos respecto al propio turista, respecto a los recursos turísticos o respecto a las decisiones económicas y financieras, gobernanza del turismo, sostenibilidad en todas sus formas y derivadas, avances y límites de la innovación en turismo, papel de los trabajadores de las empresas turísticas, etc.) o de los actores implicados (actuaciones de las administraciones públicas, repensar el papel de los distintos stakeholders, actitud del propio turista, comunidades locales, etc.). Casi todas las referencias recogidas en la bibliografía de este capítulo recogen una o varias de estas cuestiones.

Sin embargo, queda en el aire si lo que realmente hemos predicado en estos dos años, es decir, que la pandemia nos ha hecho ver las cosas de otra forma, que hemos aprendido (y mucho) de lo que ha pasado, que gracias a esto cambiaremos (y hacia mejor), provocará alguna transformación real relevante. ¿Realmente hemos aprendido? ¿Realmente nos lo hemos creído? ¿Vamos a actuar en consecuencia con el nuevo conocimiento y las nuevas perspectivas que hemos planteado durante la pandemia? ¿Van a servir de algo nuestras reflexiones? Puede que ocurra como en la anterior gran crisis, la financiera de 2008, en la que todo el mundo (hasta los ortodoxos más recalcitrantes) se planteaba la necesidad de profundos cambios en el sistema financiero global de los que nos fuimos olvidando poco a poco, tanto que nada ha cambiado finalmente. ¿Ocurrirá lo mismo con la crisis de la COVID-19 en el turismo?

Ahora que, gracias a la vacunación masiva, se está viendo el aparente final del túnel, es posible detectar ya cómo la demanda turística se reactiva siguiendo parámetros conocidos: ansia del turista/consumidor por reincorporarse cuanto antes por sus actividades de ocio y viajes en la misma forma en que lo hacía antes, elección de los mismos tipos de destino y formas de turismo, apuesta por la competencia en precios, que obliga a un fuerte control de costes que afecta a proveedores y empleados, políticas de destino basadas en gastar en promoción y no en readaptación y reconfiguración de los mismos, vuelta a los sistemas de movilidad y conectividad tradicionales apoyados incluso en las subvenciones públicas... En un horizonte de entre dos a cinco años estaremos en condiciones de juzgar hasta donde la inercia (y los intereses) ha hecho que el turismo siga su camino anterior, una vez salvado el obstáculo que ha supuesto la COVID-19, o lo que hemos aprendido nos ha ayudado realmente a reconducir ese camino a partir de una reconfiguración de la actividad turística, que posiblemente no sea bien visible más que en el largo plazo.

Los más optimistas pensarán que la innovación o las nuevas concepciones como el turismo inteligente son buenas herramientas para que nos encontremos más de lo segundo que de lo primero. Los más preocupados por la sostenibilidad dirán que esos cambios son inevitables. Y los que miran más a largo plazo creerán que todo está en manos de los que toman decisiones políticas y estratégicas tanto en la gestión de los destinos como en la gestión de las organizaciones turísticas y que en ese terreno es necesario enfrentar y cubrir, aunque sea parcialmente, un amplio grupo de intereses y necesidades de las personas, grupos y entidades implicadas y que todo es posible. No es fácil. El futuro está por escribir, pero está en las manos de los profesionales y de los académicos del turismo hacer que esta actividad suponga una fuente de bienestar económico y social y también de bienestar y enriquecimiento personal. Desde que existe el turismo ha sido básicamente así y es responsabilidad de todos que así siga siéndolo.

CONCLUSIONES

En las líneas precedentes se ha intentado plantear elementos de reflexión alrededor de varios ejes relevantes en la concepción y en la realidad de la actividad turística a partir de la disrupción que ha supuesto la pandemia provocada por la COVID-19. La elección de esos ejes ha sido guiada por la conveniencia del discurso, pero, como se ha ido señalando, los mismos están presentes en la producción académica en el campo del turismo en los dos últimos años. La conexión de los intereses económicos y los sanitarios con el turismo de por medio, la consideración del papel de lo público para mitigar y revertir los efectos de la pandemia en la actividad turística, la superación de la visión individualista a nivel personal, institucional y organizativo para procurar vías de cooperación entre las partes interesadas, la búsqueda de un equilibrio entre las visiones global y local de la actividad turística y el verdadero alcance de los cambios propuestos y de las dudas que se generan respecto al modelo turístico dominante, han servido para introducir información y reflexión sobre el turismo y la COVID-19. Con esos ejes que se han trazado no se agota un análisis, aunque sea somero, de las conexiones entre turismo y pandemia.

La aplicación de la Ciencia de Redes al turismo (Baggio 2011) muestra un interesante camino para proveer a los gestores e investigadores del sector de herramientas de análisis y también de acción para enfrentarse a fenómenos complejos desde el punto de vista social o económico como la transmisión de la pandemia y el papel de verdugo y victima que ha podido tener el turismo en ese juego. El estudio de las redes de contagio permite explicar los mecanismos sociales y de conectividad global en la transmisión del virus. Si la peste se extendía a la velocidad de una carreta hace varios siglos ahora las enfermedades contagiosas se expanden a la velocidad de los aviones comerciales que conectan el mundo.

La propia lógica de los viajes que supone el turismo, su influencia sobre las zonas vírgenes, la contribución a la contaminación y al cambio climático de muchas de sus actividades, el impulso al consumo incremental relacionado con el turismo en volumen de movimientos, pero también en la presión por la compra de productos y servicios en destino, la necesidad del contacto social como centro de la experiencia turística, etc. hacen que, sea cual sea el medio social del contagio (superficies, gotas, aerosoles...), las probabilidades del mismo se incrementen con la actividad turística. También hay que considerar los

efectos que en la transmisión de las epidemias tiene la estructura de las redes sociales y la existencia de ciertos individuos que ocupan posiciones centrales de algún tipo, por lo que están más expuestos a contagiarse y a contagiar. Muchos de esos nodos centrales son posiciones que ocupan personas vinculadas al turismo. El seguimiento de casos y la trazabilidad hubieran sido más eficaces y eficientes si se hubiesen considerado todas las posibilidades que ofrece el análisis de redes sociales. Esta solo es una muestra de cómo los elementos sociales, como la confianza o la cohesión, han condicionado la pandemia de COVID-19 y la necesidad de que sigan siendo analizados (Bollyky *et al.* 2022).

En todo caso, y volviendo a la visión económico-empresarial del turismo, lo visto hasta aquí plantea que el turismo es cada vez percibido, en las sociedades que van incrementando su poder adquisitivo y que cuentan con tiempo de ocio, más como un bien de primera necesidad que como un bien de lujo. Es cada vez más difícil prescindir de él y se está dispuesto a realizar un esfuerzo importante del gasto de rentas para conseguirlo. Con esa consideración de bien de primera necesidad, y con el efecto de imitación que mira hacia grupos con mayor disponibilidad de rentas, lo más probable es que nos encontremos en los próximos años con una recuperación total de la actividad turística y con una vuelta al crecimiento desde el lugar en el que la pandemia rompió la tendencia, por un lado, y con un alto grado de inercia sobre qué turismo se consume y cómo se consume, respecto a lo que se ha conocido en las últimas décadas. Esto suena a buenas noticias para la mayoría, pero se debe hacer un esfuerzo para que esas noticias sean aún mejores, intentando cambiar la óptica dominante del turismo por modelos más razonables, más cooperativos, más cercanos a las personas y más compatibles con el futuro.

BIBLIOGRAFÍA

ARBULÚ, I., RAZUMOVA, M., REY-MAQUIEIRA, J. & SASTRE, F. (2021), Can Domestic Tourism Relieve the COVID-19 Tourist Industry Crisis? The Case of Spain. Journal of Destination Marketing & Management, 20: 100568.

ASSAF, A. & SCUDERI, R. (2020), COVID-19 and the Recovery of the Tourism Industry. Tourism Economics 26(5): 731-733.

BAGGIO, R. (2011), Collaboration and Cooperation in a Tourism Destination: A Network Science Approach. Current Issues in Tourism 14(2): 183-189.

BENCKENDORFF, P. & ZEHRER, A. (2013), A Network Analysis of Tourism Research. Annals of Tourism Research 43: 121-149.

BOLLYKY, T.J., HULLAND, E.N. *et al.* (2022), Pandemic Preparedness and COVID-19: An Exploratory Analysis of Infection and Fatality Rates, and Contextual Factors Associated with Preparedness in 177 Countries, from Jan 1, 2020, to Sept 30, 2021. The Lancet 399(10334): 1489-1512.

CASANUEVA, C., GALLEGO, Á., CASTRO, I. & SANCHO, M. (2014), Airline Alliances: Mobilizing Network Resources. Tourism Management 44: 88-98.

CASTIGLIONI, M., GALLEGO, Á. & GALÁN, J. L. (2018), The Virtualization of the Airline Industry: A Strategic Process. Journal of Air Transport Management 67: 134-145.

DURO, J.A., PEREZ-LABORDA, A., TURRION-PRATS, J. & FERNANDEZ-FERNANDEZ, M. (2021), COVID-19 and Tourism Vulnerability. Tourism Management Perspectives 38: 100819.

FOTIADIS, A., POLYZOS, S. & HUAN, T.C. (2021), The Good, the Bad and the Ugly on COVID-19 Tourism Recovery. Annals of Tourism Research 87: 103117.

GALLEGO, I. & FONT, X. (2021), Changes in Air Passenger Demand as a Result of the COVID-19 Crisis: Using Big Data to Inform Tourism Policy. Journal of Sustainable Tourism 29(9): 1470-1489.

GODOVYKH, M., PIZAM, A. & BAHJA, F. (2021), Antecedents and Outcomes of Health Risk Perceptions in Tourism, Following the COVID-19 Pandemic. Tourism Review 76(4): 737-748.

GOLETS, A., FARIAS. J., PILATI, R. & COSTA, H. (2023), COVID-19 Pandemic and Tourism: The Impact of Health Risk Perception and Intolerance of Uncertainty on Travel Intentions. Current Psychology 42(3): 2500-2513.

HALL, C.M., SCOTT, D. & GÖSSLING, S. (2020), Pandemics, Transformations and Tourism: Be Careful What You Wish For. Tourism Geographies 22(3): 577-598.

HIGGINS-DESBIOLLES, F. (2020), Socialising Tourism for Social and Ecological Justice after COVID-19. Tourism Geographies 22(3): 610-623.

HUANG, S., SHAO, Y., ZENG, Y., LIU, X. & LI, Z. (2021), Impacts of COVID-19 on Chinese Nationals' Tourism Preferences. Tourism Management Perspectives 40: 100895.

INMARSAT (2021), Aviation Passenger Confidence Tracker 2021.

IOANNIDES, D. & GYIMÓTHY, S. (2020), The COVID-19 Crisis as an Opportunity for Escaping the Unsustainable Global Tourism Path. Tourism Geographies 22(3): 624-632.

JAIPURIA, S., PARIDA, R. & RAY, P. (2021), The Impact of COVID-19 on Tourism Sector in India. Tourism Recreation Research 46(2): 245-260.

KAUSHAL, V. & SRIVASTAVA, S. (2021), Hospitality and Tourism Industry Amid COVID-19 Pandemic: Perspectives on Challenges and Learnings from India. International Journal of Hospitality Management 92: 102707.

LIU, J. & GAO, J. (2008), Based Tourism Risk Perception Conceptual Model – A Case Study of Shanghai Residents. Tourism Science 22(5): 37-43.

McCARTNEY, G. (2021), The Impact of the Coronavirus Outbreak on Macao. From Tourism Lockdown to Tourism Recovery. Current Issues in Tourism 24(19): 2683-2692.

QIU, R.T.R., PARK, J., LI, S.N. & SONG, H. (2020), Social Costs of Tourism during the COVID-19 Pandemic. Annals of Tourism Research 84: 102994.

RAZAK, N.A. (2020), Health and Tourism: Implications of COVID-19 Pandemic to the Malaysian Travel and Hospitality Industry. Journal of Tourism and Hospitality Management 9(4): 663-670.

SÁNCHEZ-CAÑIZARES, S., CABEZA-RAMÍREZ, L.J., MUÑOZ-FERNÁNDEZ, G. & FUENTES-GARCÍA, F.J. (2021), Impact of the Perceived Risk from Covid-19 on Intention to Travel. Current Issues in Tourism 24(7): 970-984.

SHARMA, G.D., THOMAS, A. & PAUL, J. (2021), Reviving Tourism Industry Post-COVID-19: A Resilience-Based Framework. Tourism Management Perspectives 37: 100786.

SIGALA, M. (2020), Tourism and COVID-19: Impacts and Implications for Advancing and Resetting Industry and Research. Journal of Business Research 117: 312-321.

SKARE, M., RIBERIO-SORIANO, D. & PORADA-ROCHÓN, M. (2021), Impact of COVID-19 on the Travel and Tourism Industry. Technological Forecasting & Social Change 163: 120469.

TRIBE, J. (2010), Tribes, Territories and Networks in the Tourism Academy. Annals of Tourism Research 37(1): 7-33.

UGUR, N.G. & AKBIYIK, A. (2020), Impacts of COVID-19 on Global Tourism Industry: A Cross-Regional Comparison. Tourism Management Perspectives 36: 100744.

UNWTO (2022), UNWTO World Tourism Barometer (Jan 2022). Madrid: UNWTO.

UTKARSH, SIGALA, M. (2021), A Bibliometric Review of Research on COVID-19 and Tourism: Reflections for Moving Forward. Tourism Management Perspectives 40: 100912.

YANG, Y., ALTSCHULER, B. & LIANG, Z., LI, X. (2021), Monitoring the Global COVID-19 Impact on Tourism: The COVID19 Tourism Index. Annals of Tourism Research 90: 103120.

Capítulo XII
Aprendizajes desde la COVID-19 para la formación y el aprendizaje

Julio Cabero-Almenara
Universidad de Sevilla

1. Para comenzar el análisis

Cuando el 1 de enero del 2020 las personas se despertaron deseando la nueva década, pocas se podían imaginar su comienzo, pocas se podían imaginar el «tsunami» que se nos venía encima, y que drásticamente cambiaría nuestras vidas a todos los niveles, desde el sanitario, económico, social y en el que nos centraremos en el presente capítulo, que es en las instituciones de educación y en el comportamiento que sus actores iban a tener en las nuevas acciones.

De forma urgente y rápida la pandemia transformó la enseñanza de nuestras instituciones educativas, pasando de modelos fuertemente anclados en la concepción transmisiva de la formación y en la presencialidad docente-discente, a una situación fuertemente mediada por las tecnologías digitales y donde la presencialidad analógica no existía, las procesos de enseñanza-aprendizaje se realizaron fundamentalmente de manera virtual, situación instruccional muy desconocidas para una gran mayoría de los profesores y los estudiantes. Ya que muchos sistemas educativos en las Universidades se han dirigido hacia la presencialidad, con contadas ocasiones hacia la formación virtual a distancia, donde las realizadas fundamentalmente se centraban en acciones de postgrado. Esta situación transformó simultáneamente muchas variables del sistema: las estructuras organizativas de las instituciones educativas, los roles desempeñados por todos los actores del acto educativo, y ubicó a las tecnologías digitales en una posición muy relevante. Este hecho supuso un gran reto para todos los actores involucrados en la educación, ya que la formación a distancia rompe con tres de las variables clásicas de la educación presencial: la unidad de tiempo, de espacio y de acción; de quienes participan en la acción formativa, en las que cómodamente saben desenvolverse los profesores y los estudiantes.

Y es aquí donde comenzaron a aparecer algunos problemas, y también soluciones de las que debemos aprender para transformar las instituciones educativas. Tras todo período complejo surgen nuevas posibilidades y formas de repensar y reconstruir el mundo; tras la «peste negra» que fue otra de las fuertes pandemias más destructivas de la historia de la humanidad en Eurasia, surgió el Renacimiento, y sus devastadoras construcciones en la arquitectura, pintura, literatura y pensamiento filosófico, que dirigieron el mundo durante bastantes siglos.

Los problemas que surgían de esta nueva situación empezaron a despertar nuevas preguntas: ¿tenemos tecnología confiable y accesible para responder a este reto?, ¿qué hacer con las tecnologías que disponemos?, ¿qué metodologías aplicamos sobre ellas?, ¿qué contenidos vamos a transmitir?, o ¿cómo evaluaremos a nuestros estudiantes con seguridad? En definitiva, una situación de caos para algunas instituciones y docentes, respecto a los cuales se fueron dando soluciones organizativas y educativas diferentes en las distintas instituciones.

Pero lo ocurrido ha servido para diferentes aspectos, uno de ellos ha sido el acelerar el cambio hacia la digitalización que las instituciones educativas iban comenzando ya a realizar, pero también, y es lo que fundamentalmente abordaremos en el presente capítulo a poner de manifiesto algunos problemas y debilidades de los sistemas educativos.

La educación on-line puede ser una opción válida y confiable, para el aprendizaje, pero requiere planificación y diseño, utilización de metodologías diferentes a las movilizadas en la formación presencial, y bases para el diseño de materiales digitales. Y ello pasa por que el docente presente cierto dominio en competencias digitales, que garanticen el éxito de la acción formativa.

Pero antes de adentrarnos en este análisis señalar un aspecto que nos preocupa, y que se refiere a que, si la situación ha sido resuelta, entre otros aspectos gracias a las tecnologías digitales, ello nos puede llevar a caer en el error de creer que todo lo resolveremos con mayor presencia tecnológica en nuestras instituciones educativas. En favor de este procedimiento, se sitúan algunos responsables de las áreas de informática y tecnologías digitales de las instituciones educativas que ofrecen el argumento de que las plataformas virtuales se han utilizado bastante y han sido un éxito educativo. Esto es verdad, pero se olvidan de que la transferencia digital se realizaba porque los docentes subían documentos en PDF, clips de videos y materiales en PowerPoint, y realizaban acciones formativas transmisoras de información a través de los sistemas de videoconferencia, y los alumnos simplemente descargaban los materiales u observaban las clases a través de videoconferencias impartidas por los docentes, sin que por el cambio originado se hubieran modificado las estrategias y metodologías de enseñanza, que son diferentes en los contextos de formación virtual y presencial. Por ello, no será cuestión de dotarnos de más tecnologías, sino más bien de redefinir su rol en la enseñanza y de crear un servicio de apoyo permanente al docente y al discente. Y que al mismo tiempo el docente trabaje con dos premisas, como apunta Bower (2019): Premisa 1: las tecnologías digitales pueden desempeñar un papel mediador para los participantes en sus intentos de alcanzar los objetivos de aprendizaje; y Premisa 2: En contextos de aprendizaje mediados por la tecnología, las creencias, los conocimientos, las prácticas y el entorno de los participantes se influyen mutuamente. Como señaló Morozov (2015) el solucionismo tecnológico es uno de los errores más graves que podemos cometer, y desde nuestro punto de vista más aún en el sector educativo.

Hay también que señalar que lo ocurrido no ha acontecido por igual en todos los países, la desigualdad social y educativa existente entre los países, se ha puesto todavía más claramente de manifiesto en esta situación, ya que no todos los profesores y estudiantes tenían recursos en sus casas, ni ha tenido conexiones a internet estable y de calidad para seguir el proceso formativo. La transformación hacia lo on-line y su adaptación ha sido más fácil para unos estudiantes que para otros, y el estudiantado económicamente más favorecido se ha visto más beneficiando, ampliándose de esta forma la brecha social. Como señala la Unesco en un reciente documento: «En el contexto latinoamericano (y nosotros decimos que no solo latinoamericanos), las dificultades que encierra este desafío se ve incrementado por las desigualdades socioeconómicas, con las consecuentes brechas digitales, tanto de los estudiantes como del profesorado» (Rappoport, Rodríguez y Bresanello 2020: 3). De ahí que se hace necesario que los gobiernos y las instituciones educativas empiecen a adoptar en estos «nuevos tiempos» medidas específicas para solucionar el citado problema.

Hoy en día poder disponer de una conexión estable y rápida a internet no es un lujo, sino una necesidad, ya que su no disponibilidad es motivo de exclusión social.

No cabe duda de que la falta de recursos tecnológicos existentes en los hogares, la falta de recursos flexibles y adaptados a los programas y contenidos y la calidad de la conexión a Internet han condicionado la transición a la educación a distancia y la aplicación de modelos híbridos. Esto ha repercutido en la disminución de la calidad de la experiencia de aprendizaje realizada y en el aumento de la deserción escolar por parte del alumnado (Cano *et al.* 2020; Burgos, Vázquez-Cano, López-Meneses y Adaos 2021), sobre todo en el caso de los alumnos pertenecientes a colectivos más vulnerables social y económicamente (Schleicher 2021; Aditya 2021; Álvarez-Álvarez y García-Prieto 2021).

2. APRENDIZAJES DESDE LA PANDEMIA

La pandemia ha puesto de manifiesto algunas de las debilidades de los sistemas educativos, de los actores participantes en ella y de los recursos disponibles. Y el primero de ello, ya anteriormente apuntado, es la existencia de una «brecha digital»; es decir, la pandemia ha sacado a flote lo que diversos estudios institucionales han puesto constantemente de manifiesto y es hay una «brecha digital» entre países y personas (Unesco 2017). Y si las tecnologías digitales, especialmente internet, son clave en la sociedad del conocimiento, el no facilitar su acceso a costos razonables repercutirá en la marginación de ciertos países y colectivos humanos. Si analizamos la información que ofrece el «Índice de Desarrollo Humano», elaborado por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD); que es una puntuación –comprendida entre 0 y 1– para evaluar la calidad de vida en un país, en función de las puntuaciones alcanzadas en tres variables: una vida larga y saludable, acceso a educación y un nivel de vida digno (http://hdr.undp.org/sites/default/files/hdr_2019_overview_-_spanish.pdf). Nos daremos cuenta de que existe una correlación alta y positiva entre un mayor índice y una mayor presencia de internet en un país. Esta «brecha digital-brecha social», puede observarse con completa claridad en los artículos

publicados en el monográfico de la *Revista Internacional para la Justicia Social*, publicado en el 2020 (vol. 9, n.º 3) denominado «Consecuencias del cierre de escuelas por el COVID-19 en las desigualdades educativas».

Pero la «brecha digital» no solo se refiere al acceso a las tecnologías, sino también al conocimiento que tenemos de ellas, y a las cosas que somos capaces de hacer con las tecnologías y para qué (Cabero y Ruiz-Palmero 2017). Si pensamos en el docente, esto se traduce en qué puede hacer él con estas herramientas, en un momento de no presencialidad, para desarrollar el proceso formativo y esto ya apuntó un problema. En gran medida, lo que se ha intentado es replicar en lo virtual lo que se ha hecho antes en lo presencial, sin reflexionar que se trata de dos contextos diferentes que requieren, tanto al docente como al estudiante, movilizar habilidades y competencias diferentes. Pero a ello nos referiremos posteriormente.

Esta «brecha digital» viene en unos casos determinada por las creencias que algunos docentes tienen respecto a las tecnologías, si hay algo que hemos podido ir aprendiendo de la historia de la incorporación de las tecnologías a la enseñanza una de ellas, es que las creencias que el docente tenga respecto a las posibilidades que las tecnologías le pueden ofrecer para su desarrollo profesional son clave, no solo para que la incorpore, sino también para la forma en la cual las incorporarían (Prestridge 2017; Bahçivan, Güneş y Üstündağ 2018; Burke, Schuck, Aubusson, Kearney y Frischknecht 2018; Torres-Diaz *et al.* 2015). Como señalan De Vries, Van de Grift y Jansen (2014: 339): «Las creencias de los docentes sobre el aprendizaje y la enseñanza son proposiciones sobre el aprendizaje y la enseñanza que un maestro sostiene que son verdaderas; se desarrollan durante los muchos años que los maestros pasan en la escuela, primero como estudiantes, luego como profesores y maestros, y con el tiempo y el uso, estas creencias se vuelven robustas».

Desgraciadamente, una gran parte del profesorado sigue percibiendo a las tecnologías como un mero añadido al proceso de enseñanza, y no como palancas de cambio e innovación educativa, a través de las cuales podamos establecer escenarios fortalecidos por ellas para la colaboración, la interacción, la innovación y construir nuevas formas de relacionarnos con la realidad. Como señala Guri-Rosenblit (2018: 100): «En la mayor parte de las instituciones de educación superior, las nuevas tecnologías sirven principalmente para realizar funciones adicionales y no para sustituir los encuentros presenciales o para una enseñanza intensiva mejorada mediante el uso de internet». De todas formas, como aporta Pedró (2021: 23): «Debemos reconocer que en el sector de la educación superior tampoco estábamos preparados para una disrupción como la que ha traído consigo la pandemia de la COVID-19. Los cierres, como medida para contener la pandemia, han llevado a un despliegue acelerado de soluciones de educación a distancia para asegurar la continuidad pedagógica también en la educación superior. Los obstáculos son múltiples, desde tecnológicos y pedagógicos hasta financieros».

Y ello se debe en gran medida a la formación que posee el docente para su incorporación a la práctica educativa. Docente que sigue pensando que su función básica es la de transmitir y estructurar la información. Por el contrario, y sin negar que lo apuntado sigue siendo una función clave a desempeñar por el docente, no debemos dejar de reconocer que su función como «transmisor de información» ha dejado en las instituciones de la sociedad del conocimiento de ser tan significativa como lo era en las instituciones de formación de la sociedad industrial y postindustrial, y han surgido otras que adquieren más significación como son: ser consultores de información y facilitadores del aprendizaje; diseñadores de situaciones mediadas de aprendizaje; proveedores de contextos y escenografías formativas; moderadores, tutores virtuales, orientadores, y guías; evaluadores y seleccionadores de tecnologías; y curadores de contenidos (Cabero y Barroso 2015). Estas nuevas funciones aparecen en los nuevos marcos de competencias digitales que deben poseer los docentes y que se están formulando recientemente, como es el caso del DigCompEdu de la Unión Europea (Cabero y Palacios 2020; Cabero, Romero, Barroso y Palacios 2020). Marco de competencias que ha sido seleccionado por el «Consejo de Rectores de la Universidades Españolas» y la «Consejería de Educación y Deportes» de la Junta de Andalucía como marco para la formación del profesorado en las competencias digitales.

A pesar de lo indicado, también nos hemos encontrado una serie de prácticas innovadoras en la aplicación de las tecnologías digitales por parte de los docentes durante la pandemia que sería interesante evaluar e investigar. Dichas prácticas han favorecido el aprendizaje autónomo y autorregulado por los estudiantes, así como las acciones formativas colaborativas, transformando con ellas las prácticas escolares y repercutiendo en que los estudiantes alcanzaran altos niveles de satisfacción por estas enseñanzas (Ellis *et al.* 2020; Kidd y Murray 2020; Morocho 2021; Trujillo 2021).

Esta falta de formación del profesorado ha llevado a que en los momentos de pandemia, lo que ha realizado el docente puede resumirse en la realización de muchas videoconferencias y en las transferencias –que hace a sus alumnos– de documentos en diferentes formatos, fundamentalmente pdf; es decir, el docente ha seguido un modelo transmisivo sin considerar las posibilidades que la tecnología le ofrecía para, por ejemplo, crear entornos colaborativos de aprendizaje y poner en acción

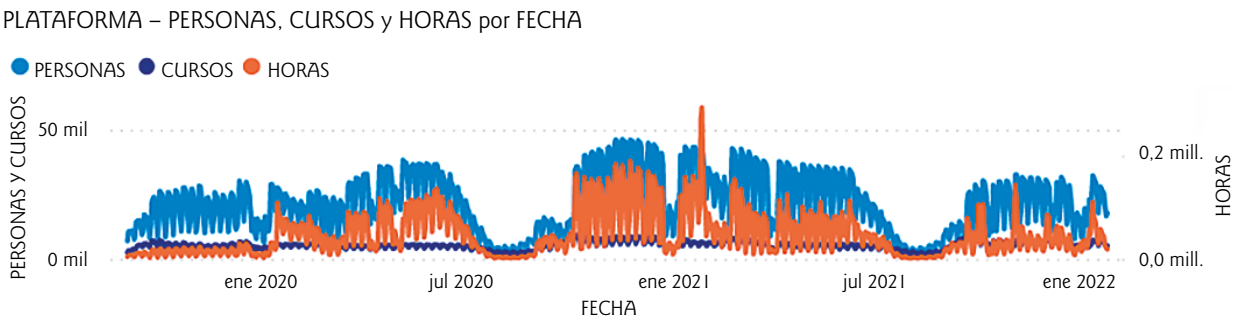


Figura 1. Uso plataforma de la Universidad de Sevilla, por fechas (https://cutt.ly/llN25Vd)

nuevas estrategias, como el estudio de casos, la resolución de problemas, la aplicación del método de proyectos, la elaboración de blogs colaborativos, la indagación y evaluación de la información existente en internet. En definitiva, para poner en acción nuevas metodologías y prácticas de enseñanza que requieren la participación activa de los estudiantes.

De todas formas, se debe reconocer que la pandemia ha tenido en este aspecto una cuestión significativa y es que los docentes han mejorado como consecuencia de esa exposición forzada a la que vieron su capacitación tecnológica y han cambiado el imaginario que tenían sobre las Tecnologías de la Información y Comunicación (Beardsley *et al.* 2021; Navarro-Espinosa *et al.* 2021; Scully, Lehane y Scully 2021). En el último claustro del año 2021 de la Universidad de Sevilla, el rector comentaba que el uso de la plataforma que la Universidad de Sevilla ponen a disposición de los profesores y estudiantes, se había mantenido su volumen de utilización casi igual que en tiempos de pandemia, luego los docentes han percibido la utilidad que estas plataformas tienen también en tiempos de presencialidad (fig. 1). Otro aspecto diferente, sería analizar para que la utilizan que creemos que se apoya bastante en ser un «repositorio de objetos de aprendizaje», pero al menos habían cambiado su imaginario sobre la utilidad que podría tener esta herramienta para la enseñanza.

Ejemplo de lo comentado, se pueden localizar a través de diferentes aspectos: uno de ellos, es lo que realizan los profesores en las plataformas a través de las cuales tienden a movilizarse mediante un modelo transmisivo como encontraron en su investigación Samaniego, Marqués y Gisbert (2015). Como sugiere Guri-Rosenblit (2018), los profesores realizan más en las plataformas virtuales acciones de *e-reading* que de *e-teaching*. Todo ello, repercute en la baja calidad y volumen de interacción y retroalimentación de la actividad del estudiante, que se convierte en una constante (Smith y Xu 2016; Shah y Cheng 2018). Prensky (2011) ya apuntaba que la problemática no es solo cambiar de tecnología, sino también de la concepción que tengamos del aprendizaje. Y no se debe olvidar que los cambios tecnológicos son rápidos, y los culturales y educativos, lentos.

Por otra parte, nos seguimos olvidando que un componente clave para producir una enseñanza de calidad en la formación virtual son las e-actividades (Silva 2017). Y en este sentido, los docentes seguimos teniendo una creencia de la enseñanza más orientada hacia los contenidos que hacia el estudiante (De Vries, Van de Grift y Jansen 2014). Y esta diversidad de e-actividades (e-talleres, estudio de casos, métodos de proyectos, análisis de documentos, líneas de tiempo, cazas del tesoro...) favorecen una enseñanza activa.

Y frente a todo este maremágnum de percepciones, docentes y discentes, se han encontrado de forma rápida y traumáticamente, en un cambio radical hacia un escenario para el cual no estaban preparados, lo que facilitó que se produjeran situaciones de inseguridad, estrés y desmotivación.

Ello nos lleva a plantear uno de los grandes problemas surgidos que es el referido a la formación que posee el profesorado para, por una parte, la incorporación curricular de las TIC, y por otra, para desarrollar su actividad docente en entornos virtuales a distancia o en entornos híbridos, donde se combinan acciones formativas presenciales con acciones a distancia apoyas en tecnologías digitales. Aspecto de la formación del profesorado que hemos abordado en diferentes trabajos y a los que remitimos al lector interesado para no extendernos en el presente trabajo (Cabero y Valencia 2018; Cabero y Martínez 2019). Pero de todas formas si nos interesase destacar que la formación del profesorado para la incorporación de las Tecnologías de la Información y Comunicación a la enseñanza debe hacerse desde presupuestos diferentes a los que tradicionalmente se han venido realizando, que han tenido un marcado acento utilitario, transmisivo y tecnológico; y en consecuencia con una fuerte falta de orientación educativa y pedagógica. Desde nuestro punto de vista debe asumirse que la formación del docente para la incorporación de las TIC es un proceso gradual que pasa desde un proceso de adopción a la innovación, es decir, por empezar a utilizarlas para hacer

lo mismo que hacía sin ellas hasta llegar a un proceso de crear nuevas prácticas con TIC no habituales en su contexto. Por otra parte, se debe realizar bajo nuevos modelos y perspectivas como el del TPACK formulado por Mishra y Koehler (2006) o la adaptación «TPeCS» (Tecnología, Pedagogía, Contenido y Espacio) recientemente formulada por Kali, Sagy, Benichou, Atias y Levin-Peled (2019). Modelos que sugieren que el docente para incorporar las TIC en la enseñanza debe poseer diferentes tipos de conocimientos: tecnológico, pedagógico, de contenido y de espacio; conocimientos que interaccionarán entre sí para crear diferentes prácticas y escenarios formativos. Por otra parte, no se debe olvidar que ya existen marcos en competencias establecidos por diferentes países que ofrecen pistas para conseguir modelos estables que permitan establecer una evaluación del docente y un desarrollo profesional en el alcance de estas competencias digitales (Romero-Tena, Barragán-Sánchez, Llorente-Cejudo y Palacios-Rodríguez 2020). Esta formación del profesorado en metodologías no presenciales será clave en situaciones del futuro, porque la experiencia adquirida en los momentos de pandemia va a repercutir para que vayamos hacia un modelo híbrido de formación, donde se combine lo presencial y lo virtual. Como señalan Hordatt y Haynes-Brown (2021), la transición a la enseñanza en línea impuesta durante la pandemia de COVID-19 ha acelerado la integración de las TIC por parte de los docentes en América Latina y el Caribe, ya que antes de la pandemia, la adopción de las TIC por parte los docentes era lenta, y la pandemia cambió la forma respecto a lo que pensaban los docentes respecto a las TIC y la formas de utilizarlas, tendiendo hacia un cambio en las percepciones respecto a las posibilidades que las mismas le ofrecen para la enseñanza.

En definitiva, la formación del docente debe ir más allá del dominio instrumental de las tecnologías, y debe fuertemente insertarse en la adquisición de competencias pedagógicas para saber trabajar intelectualmente con las tecnologías, en la indagación, investigación personal, creación de mensajes y construcción de conocimientos. Aspecto que debe llevarle al docente a cambiar el imaginario que tiene sobre las TIC (Tecnologías de la Información y Comunicación), y pasar a contemplarlas y aplicarlas como TAC (Tecnologías de Aprendizaje y Conocimiento) y TEP (Tecnologías para el Empoderamiento y la Participación) (Cabero 2014; Pinto, Cortés y Alfaro 2017).

Esta falta de formación, y de inseguridad y confianza en las Tecnologías de la Información y Comunicación por parte del profesorado, se vio muy reforzada cuando llegó la situación de la evaluación de los estudiantes. La preocupación por las acciones de plagio, y el cambio de identidad, por parte de los estudiantes fue una fuerte preocupación de los docentes. Las medidas que adoptaron las Universidades para apoyar a sus profesores en la situación de pandemia fueron diversas, en el caso de la Universidad de Sevilla una de ellas fue la creación por Resolución Rectoral de 24 de abril de 2020 de un «Grupo Asesor de Apoyo Pedagógico en Tecnologías Educativas y Recursos Digitales», cuya función principal era ofrecer propuestas viables al profesorado para la adquisición de la docencia no presencial.

Grupo de Apoyo Pedagógico que estuvo constituido por diez profesores de diferentes disciplinas: medicina, farmacia, filología, ingeniería informática y ciencias de la educación). Por motivos del cargo que ocupaba en ese momento me encargaron la coordinación del citado grupo, su función básica era ofrecer propuestas viables al profesorado para la adaptación de la docencia no presencial, de acuerdo con el documento «Pautas y recomendaciones de la Universidad de Sevilla para la elaboración y realización de evaluación no presenciales ante la situación creada por el COVID-19. Herramientas virtuales disponibles» (https://cutt.ly/UIN93hO). La Resolución Rectoral determina además que el Grupo Asesor Pedagógico contribuirá al proceso de transformación detallado con la elaboración de materiales formativos y la asesoría sobre la diversidad de procedimientos que se pueden seguir para afrontar el proceso de docencia en Blackboard Learn, Blackboard Collaborate Ultra y/o MS Teams para la comunicación, docencia, tutorización y evaluación del alumnado, incluyendo en esta asesoría los procesos vinculados a la defensa de TFE en modalidad virtual. Para el contacto y la resolución de dudas del profesorado se creó un correo electrónico: ayudadigital@us.es, y los miembros del grupo se repartieron en dos niveles, para atender por una parte a los profesores con un conocimiento básico de las herramientas utilizadas para la formación virtual y otro para los que tenían un conocimiento avanzando, y poder ofrecer de esta forma respuestas adecuadas a los niveles de dominio tecnológico y pedagógico indicado por los docentes. Al mismo tiempo se elaboró un formulario web de preguntas para recabar información sobre las necesidades formativas del docente que solicita asesoría, y de esta forma organizar la información en función de áreas de conocimiento y nivel de capacitación digital, así como también la elaboración de materiales audiovisuales y multimedia autoformativos. El cuestionario fue cumplimentado por 692 docentes, y se repartía en diferentes bloques: diseño de enseñanza, estudiantes, enseñanza, prácticas, evaluación, tutorías, comunicación, trabajo en equipo, innovación docente y normativa y organización. Algunos de los resultados encontrados fueron: a) en el bloque diseño de enseñanza, la opción más demandada es la de «diseñar contenidos digitales: vídeos, presentaciones, animaciones para incluir

en la plataforma», elegida por el 64,4 %. Además, hay otras opciones que las han elegido el 50 % de la muestra; b) en el de estudiantes, la de «desarrollar técnicas de motivación», con un porcentaje de 70,7 %; c) en el de enseñanza: «desarrollar actividades que estimulen la capacidad crítica y reflexiva del alumnado» (57,5 %); d) en el de prácticas: el de «evaluar las competencias prácticas de los estudiantes» (55,5 %); e) en el de evaluación: «diseñar pruebas para la evaluación online de los estudiantes» (67,4 %); f) en el de tutorías: el de «orientar el trabajo académico del alumnado» (56,5 %); g) en el de comunicación: el «mejorar las competencias lingüísticas en una segunda lengua (inglés)» (54,8 %); h) en el de trabajo en equipo: «la gestión y organización del tiempo» (58,2 %); i) innovación docente: el «desarrollar nuevos instrumentos, materiales o recursos didácticos para la mejora de las competencias profesionales» (61,6 %); y j) en normativa y organización: el «conocer los derechos y deberes del profesorado» (75,4 %).

Para ello se siguieron diferentes vías, que fueron desde una atención personalizada, organización de webinar, elaboración de recursos explicativos (clip de vídeos, animaciones y animaciones) y la organización de cursos formativos reducidos. Todos los materiales elaborados y las sesiones de webinar organizadas se incorporaron en una web a la cual el profesor acedía desde la plataforma de teleformación de la Universidad de Sevilla (fig. 2).

Hay que señalar que un gran volumen de las grandes preocupaciones de los docentes se situaba en este aspecto de la evaluación. Ello posiblemente se debiera, independientemente de la creencia en la debilidad y credibilidad que lo virtual podría tener para la evaluación de las competencias y los conocimientos adquiridos por los estudiantes, a la propia debilidad de los docentes respecto al conocimiento de diferentes formas de evaluar a los estudiantes: por actividades, métodos de proyectos, estudios de casos, herramientas de evaluación ofrecidas por las propias plataformas...; o a la aplicación de una evaluación continua. Una gran mayoría de docentes mostraron verdaderos recelos respecto a la evaluación on-line respecto a diferentes aspectos, como fueron que garantizara la equidad, la seguridad jurídica y la transparencia. Sobre todo, cuando los sistemas de supervisión remota o e-proctoring no estuvieron autorizados.

Una revisión de las diferentes técnicas e instrumentos que pueden utilizarse en la evaluación *online*, puede observarse en la obra de García-Peñalvo (2020) que recoge las propuestas realizadas por las Universidades de Castilla y León para sus docentes. En el documento se presentan una diversidad de técnicas y estrategias, como, por ejemplo: pruebas objetivas, pruebas de respuesta corta, pruebas orales, portafolios, memorias de trabajos, producción de recursos audiovisuales e informáticos, trabajos escritos...

La función meramente «transmisora» que han realizado muchos profesores en los momentos de pandemia, ha implicado un problema adicional, que ha sido la sobrecarga de trabajo para los estudiantes, debido a la falta de experiencia e inseguridad que la no presencialidad ha supuesto para el docente. Se puede decir que la presencialidad fue sustituida por una sobrecarga de trabajo. Si bien, la sobrecarga también alcanzó a los docentes, y ya empiezan a aparecer investigaciones que ponen de manifiesto cómo la pandemia incrementó su carga laboral y la jornada de trabajo (Allen, Rowan y Singh 2020). Pedró (2021) señala los resultados de una investigación realizada durante la última semana de marzo entre estudiantes de educación superior en Estados Unidos que revelaba que un 75 % afirma haber experimentado ansiedad y depresión como resultado de la crisis. «Inevitablemente, la pérdida de contacto social y de las rutinas de socialización que forman parte de la experiencia cotidiana de un estudiante de educación superior tendrá un costo. El aislamiento que va inevitablemente asociado al confinamiento tendrá efectos en términos de equilibrio socioemocional que dejarán huella, en particular en aquellos estudiantes con problemáticas preexistentes en este dominio. A los estudiantes más vulnerables que participan en programas de nivelación y apoyo, el aislamiento les golpea aún más fuerte» (Pedró 2021: 28).

El exceso de información provocó en los estudiantes consecuencias emocionales: inquietud, estrés, ansiedad, inseguridad, soledad y desmotivación. Hecho que llevó al profesorado a desempeñar un nuevo rol que es el de apoyo socioemocional de los estudiantes, entre otros motivos por el desconcierto de los estudiantes a trabajar en contextos no usuales para ellos, como son el contexto familiar, las plataformas tecnológicas y los sistemas de videoconferencias (CEPAL-UNESCO 2021).

Por otra parte, diferentes investigaciones han puesto de manifiesto que la falta de capacitación digital por parte de los docentes ha sido compensada en algunos casos mediante la creación de un clima afectivo basado en la empatía, el optimismo, la retroalimentación y la motivación constante a los estudiantes (Maile, Mena y Feinauer 2020; Ryan 2021; Yates *et al.* 2021). Repercutiendo todo ello en la creación de acciones educativas exitosas.

Por otro lado, la situación también ha mostrado sus dificultades, y ello ha podido reflejarse en el hecho de que también han tenido el mismo desconcierto e inseguridad a trabajar en los mismos contextos tecnológicos que sus profesores, fundamentalmente debido a las condiciones de conectividad y falta de formación. Y es en este momento, donde debemos parar a realizar una profunda reflexión sobre uno de los mitos que ha corrido en los últimos tiempos el ámbito de la tecnología: el de los «nativos e inmigrantes digitales»; el cual ha llevado a

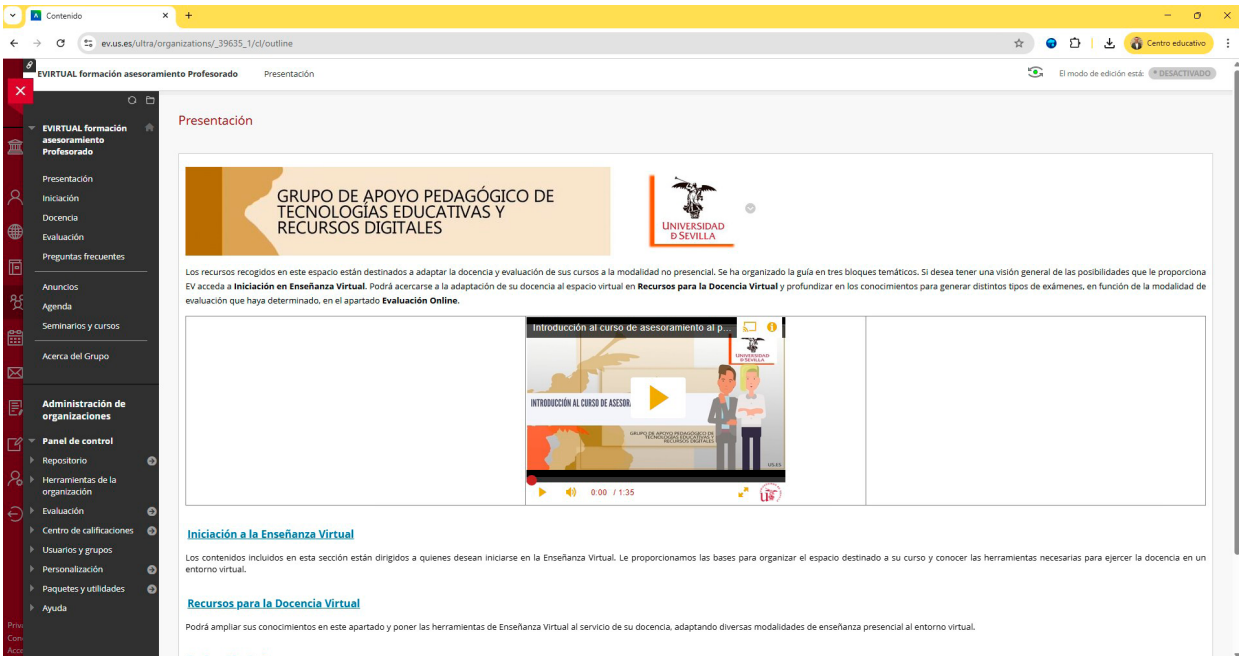


Figura 2. Portal de ubicación de los materiales elaborados por el «Grupo de Apoyo Pedagógico»

proponer que los nacidos en contextos tecnológicamente enriquecidos y, normalmente referido al mundo de Internet, son considerados como «nativos»; y los nacidos en otros contextos tecnológicos, como el impreso o audiovisual, serían los considerados como «emigrantes» digitales, todo ello justificándose bajo esta perspectiva de que los primeros poseen conocimientos y habilidades que les permiten manejar las herramientas de las tecnologías digitales de forma «natural» y prácticamente sin esfuerzo; mientras que los «emigrantes» presentan problemas para desenvolverse con ellas. Trasladado el mito al contexto educativo, supondría que los alumnos son muy competentes en el manejo instrumental de las tecnologías, y, por el contrario, los docentes no lo son; lo que supone que los docentes se perciben como descualificados en los entornos tecnológicos, y los estudiantes con altas capacidades. Las investigaciones y la pandemia muestran en realidad lo contrario, ya que los estudiantes no son tan competentes para el uso de las tecnologías aplicadas a la formación como desde ciertos sectores se nos quiere hacer creer, ya que usan más bien un limitado número de ellas, y en que los usos a los que las destinan se centran más en el ocio que en acciones formativas (Vázquez-Cano, Gómez-Galán, Infante-Moro y López-Meneses 2020; Wang, Hsu, Campbell, Coster y Longhurst 2014; Lai y Hong 2015; Castellanos, Sánchez y Calderero 2017; Sorgo, Bartol, Dolnicar y Boh 2017). Diferencias que, también se dan dentro del contexto universitario (Álvarez-flores y Núñez 2019; Bossolasco, Chiecher y Santos 2020). Tales han sido los resultados de las diferentes investigaciones llevadas a cabo que los autores consideran que, más que nativos digitales, se les debe de renombrar como estudiantes digitales (Gallardo 2012; Casati 2015), simplemente por la rapidez con la que manejan algunas tecnologías desde un punto de vista instrumental.

Por lo expresado, se hace cada vez más necesario, y esta crisis educativa lo viene a corroborar, establecer planes de formación en competencias digitales de los estudiantes (Romero-Tena, barragán-Sánchez, Llorente-Cejudo y Palacios-Rodríguez 2020; Infante-Moro, Infante-Moro y Gallardo-Pérez 2020).

Esta complejidad ha afectado al estudiante, en primer lugar, porque en situaciones de no presencialidad, en aprendizajes mediados por la tecnología, el estudiante debe poseer altas competencias para la autorregulación de su propio proceso de aprendizaje, debe adquirir competencias para dirigirse hacia un aprendizaje autónomo y debe aprender a dialogar con el maestro a través de diferentes herramientas de comunicación sincrónicas y asincrónicas. En definitiva, debe poseer, además de la competencia anteriormente indicada, otras como la de gestión del tiempo, de la evaluación de la información, la lecto-escritora y la de colaboración. Esta última, según los hallazgos de una de nuestras investigaciones, no figura en las preferencias de los estudiantes, aunque pueda parecer lo contrario (Cabero 2013).

Por otra parte, los mismos docentes opinan que sus estudiantes no tienen las competencias anteriormente señaladas. En una encuesta realizada en Chile, solo un 9% opinaban que sus estudiantes cuentas con hábitos para estudiar de forma autónoma, y una cuarta parte de ellos, cree

que sus estudiantes tienen las habilidades para usar aplicaciones de trabajo a distancia (CEPAL-UNESCO 2021).

También relacionado con los estudiantes es otro de los mitos que circulan respecto a las tecnologías digitales es que, por encima de cualquier otra razón, los estudiantes las prefieren para aprender. Como han demostrado Parodi, Moreno de León, Julio y Burdiles (2019) en sus investigaciones, los alumnos prefieren leer la documentación en las pantallas del ordenador cuando el contenido es liviano para su aprendizaje, pero, por el contrario, optan por trabajar con documentación impresa cuando la información es profunda y significativa para su aprendizaje y pruebas de evaluación. Como sugirió Salomon en su teoría de AME (Amount of Invested Mental Effort), las actitudes y percepciones que tienen los alumnos respecto a las tecnologías condicionan el esfuerzo mental que invierten a la hora de procesar la información: las percepciones fáciles los llevarán a invertir menos esfuerzo mental y, en consecuencia, a alcanzar menos información –como en el caso de la televisión–, mientras las percepciones de dificultad –como la mostrada hacia el libro de texto– los llevarán a invertir más esfuerzo mental y a capturar de forma más profunda la información (Salomon 1983 y 1984). Por lo tanto, no se trata solo de la tecnología *per se*, sino también de la percepción que el estudiante tiene de ella.

Otro de los problemas con los que se han encontrado los docentes ha sido la falta de materiales digitales a los que han tenido acceso, que es una consecuencia de diferentes acontecimientos: la cultura individualista en la que suele trabajar el docente –que lo lleva a producir sus propios materiales– y no querer compartirlos con «nadie», la fuerte dependencia que los centros han tenido de los materiales impresos, la falta de materiales digitales producidos institucionalmente y de acceso libre, y la falta de formación del profesorado para saber localizarlos en repositorios y posteriormente utilizarlos

El diseño y la producción de materiales digitales para la enseñanza exige un fuerte esfuerzo para el docente, y por ello es importante abordarlo de manera colaborativa: una forma de trabajo poco usual en nuestras instituciones educativas, y que se presenta como una de las competencias digitales que debe poseer el profesor para desarrollarse en las instituciones educativas de la sociedad del conocimiento (Cabero, Romero, Barroso y Palacios 2020).

La Fundación Telefónica (2016), en una investigación que analizó centros educativos no universitarios y de diferentes niveles de enseñanza, y que eran considerados centros de «buenas prácticas» y bien preparados para enfrentarse a los retos de la educación de la sociedad del conocimiento, encontró que todos ellos compartían una serie de principios: 1) Liderazgo y compromiso, 2) Diseño de un plan de innovación, 3) Aprendizaje basado en proyectos, 4) Aulas cooperativas, 5) Énfasis en las competencias, 6) Encaje curricular en un marco innovador, 7) Trabajo más allá del libro de texto, 8) Rol del educador como guía y activador, 9) Colaboración entre docentes y centros, 10) Redefinición de los tiempos y espacios, 11) Apertura al entorno y 12) La tecnología como vía de integración... y palanca de cambio. También las relaciones del docente con la familia se han transformado, ya que los padres en esta situación han desempeñado un papel muy significativo, convirtiéndose en una extensión del docente en su domicilio. Esto ha exigido también que los padres posean ciertas competencias, no solo académicas, sino también digitales. Si bien, se han detectado algunos errores, como el intento de romper, en los domicilios, los hábitos que los hijos tenían antes de la pandemia, y pretender que estos realicen tareas constantemente. Si en la escuela el niño o el adolescente no está ocho horas concentrado, no se le puede pedir que esté así en su domicilio.

3. APRENDIZAJES QUE DEBEMOS ADQUIRIR

Los aprendizajes que se deben adquirir tras todo lo acontecido, y teniendo en cuenta la inmediatez de lo ocurrido y la falta de un tiempo para el estudio, análisis y reflexión en profundidad; van en diferentes direcciones, más teniendo en cuenta el desconocimiento que seguimos teniendo respecto al mantenimiento de la situación. Pero, independientemente del futuro que acontezca, debemos empezar a pensar que los entornos formativos que vendrán se apoyarán más en las tecnologías digitales de lo que se venía haciendo, con la necesidad implícita de utilizar e incorporar las tecnologías para crear entornos más diversificados de los que existían y estaban creados en la actualidad. La formación híbrida será uno de los escenarios formativos en los cuales nos desenvolveremos en los niveles superiores de enseñanza. Cada vez nos vamos a encontrar más cerca de la combinación de escenarios mixtos formativos que combinen lo presencial con lo virtual, como ocurre con la estrategia del «Flipped Classroom», en los cuales la utilización de las tecnologías se considera clave para su desempeño y desarrollo, y donde la tecnología juega un papel clave para que los estudiantes accedan a la información que desea presentarle el docente.

Una de las primeras cosas que debemos aprender de esta experiencia es transformar el imaginario social y académico, que desde ciertos sectores educativos se ha creado sobre la formación virtual, presentándola como una formación de segunda categoría respecto a la presencial. Ambos tipos de formaciones tienen sus ventajas e inconvenientes, y su predilección va a venir marcada por diferentes variables que comprenden desde la edad de los

estudiantes hasta la tipología de contenidos por transmitir, sin olvidarnos de las competencias que se desea alcanzar en el acto instruccional. Y lo aprendido, en estos momentos, también nos debe servir para transformar nuestra creencia, y el imaginario social, referido a que la formación a distancia virtual es una formación de segunda clase. Y no lo es, y estamos convencidos, por diferentes motivos: ya existe suficiente investigación que ha puesto claramente de manifiesto que los alumnos aprenden con ambos modelos formativos; porque cada vez más centros de formación presencial trasladarán parte de su carga docente de lo presencial a lo virtual; y porque la multitud de posibilidades que ofrecen las tecnologías digitales para la creación de entornos interactivos. Una cosa es la presencia física, y otra la presencia cognitiva, y no hay que olvidar que lo que garantiza acciones formativas de calidad es la presencia cognitiva entre todos los participantes en la acción formativa. En esta vorágine que el COVID19 ha provocado en los países afectados con una virulencia brutal, debemos ser conscientes que, una vez pasado el período de adaptación obligada, es momento de reflexionar y entender que, ahora tenemos más medios y muchos más mecanismos para contrarrestar estas situaciones, y la formación telemática ya lleva ofreciéndonos grandes posibilidades demostradas a lo largo de muchos años.

Este imaginario, que incluso en la actualidad es defendido por ciertas autoridades académicas –con una defensa acérrima de la vuelta, lo antes posible, a la presencialidad, incluso en contextos universitarios–, va a ir calando en los docentes y, como sabemos, las creencias que se tengan sobre la enseñanza condicionarán el comportamiento que tendremos en ella. De forma que, si lamentablemente, la situación se agrava, y hay que regresar al confinamiento, un grupo de profesores habrá asumido ya la idea de que lo que van a realizar es una acción educativa de segunda categoría. Y no habremos aprendido nada de lo ocurrido y de las «buenas prácticas» realizadas. Por otra parte la «nueva normalidad» nos facilita que experimentemos sobre las posibilidades del aprendizaje híbrido.

Lo importante no es que la formación sea presencial o a distancia, sino que sea de calidad. Una cuestión es la distancia «física» y otra la «cognitiva», y lo que repercute en la calidad de la formación es que la segunda sea mínima. Esto puede garantizarse con las diferentes herramientas de comunicación, sincrónicas y asincrónicas, que puede movilizar el docente en la formación virtual. Lo importante, como sugirieron en su momento Garrison y Anderson (2010), es que el docente garantice tres tipos de presencia en la formación virtual: cognitiva, social y docente. En la tabla 1, se presenta el significado que, para los autores citados, tienen estos tres tipos de presencia.

Ahora bien, desde la institución educativa se debe ser consciente que la resistencia al cambio se seguirá produciendo en el profesorado, sobre todo si una de las barreras que dificulta la adaptación a la innovación no es potenciada, como es el apoyo institucional que facilite la transformación, cambio y adaptación por parte del docente (Magen-Nagar y Maskit 2016; Salim y Luo 2019). Como indican Sosa, Salinas y De Benito (2018), nos encontramos con diferentes factores que pueden dificultar la incorporación de las tecnologías emergentes a la enseñanza. Las dificultades las señalan en diferentes tipos de niveles: microsistema (el profesor), mesosistema (condiciones de infraestructura y apoyo formal e informal a los

Tabla 1. Definiciones de los tipos de presencia que debe desarrollar el docente en acciones formativas (Garrison y Anderson 2010)

Tipo de presencia	Conceptualización
Cognitiva	«se refiere a los resultados educativos pretendidos y conseguidos. Entendemos la presencia cognitiva «como el punto hasta el cual los estudiantes son capaces de construir significado mediante la reflexión continua en una comunidad de investigación» (Garrison y Anderson 2010: 50). Es, por tanto, un proceso de pensamiento crítico. Y está estrechamente relacionado con el contexto donde el aprendizaje se produce. Implican la utilización de habilidades cognitivas de orden superior, que se mejoran cuando se llevan a cabo acciones de aprendizaje cooperativo.
Social	«la capacidad de los participantes en una comunidad de investigación de proyectarse a sí mismos social y emocionalmente, como personas "reales" (es decir, su personalidad plena), mediante los medios de comunicación en uso» (Garrison y Anderson 2010: 50). Un alto uso de la presencia social repercute positivamente en el aumento de la presencia cognitiva.
Docente	«La presencia docente es definida como la acción de diseñar, facilitar y orientar los procesos cognitivo y social con el objetivo de obtener resultados educativos personalmente significativos y de valor docente... La presencia docente es importante para estructurar las actividades educativas, controlar los debates y equilibrar la calidad y cantidad de las aportaciones de los participantes. Pero el profesor, además, debe animar la reflexión y el discurso mediante la crítica constructiva» (Garrison y Anderson 2010: 51-52).

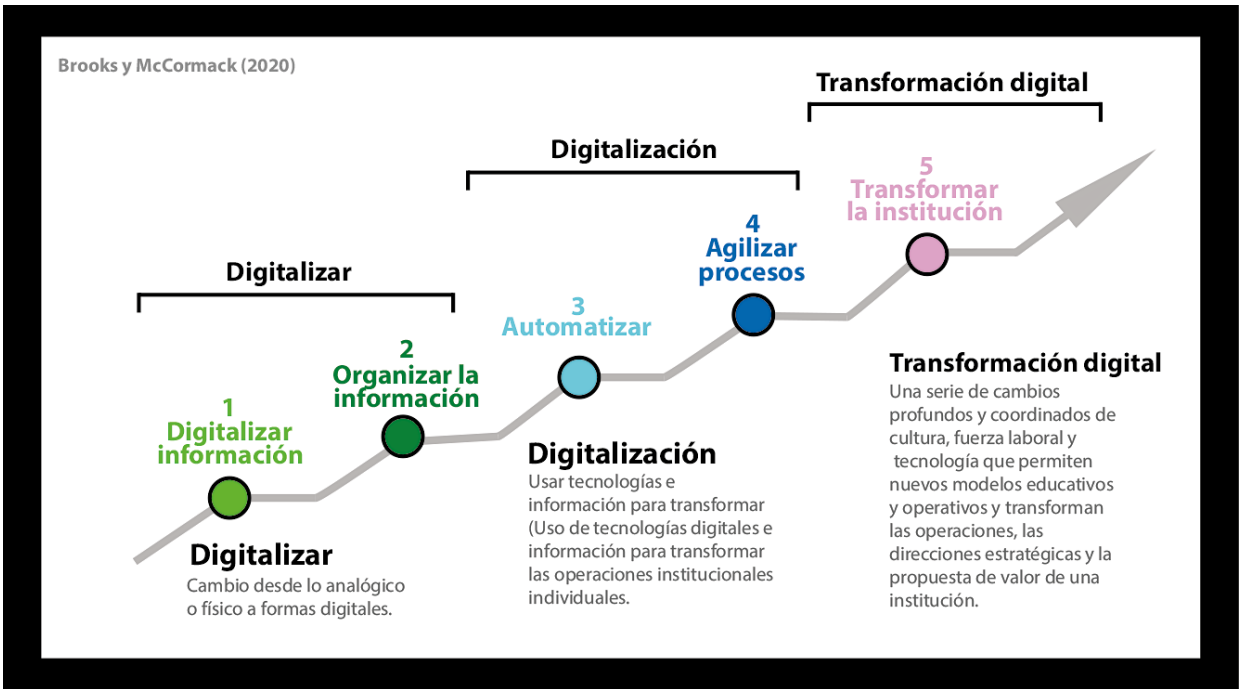


Figura 3. Fases de transformación digital de las Universidades (Brook y McCormack 2020)

profesores), exosistema (el exosistema son los factores vinculados a la opinión de terceros, la experiencia y la satisfacción de otras personas) y macrosistema (políticas ministeriales).

Desgraciadamente, si hay dos factores que han influido de manera imperiosa a potenciar la denominada brecha digital esos han sido, sin lugar a duda, la falta de recursos tecnológicos y la conectividad; provocando ambos un impacto enorme en términos de equidad social. Estas situaciones problemáticas deben ser abordadas con carácter urgente y en profundidad de cara al futuro. Se puede decir con completa claridad que en la actualidad el no acceso de calidad a estos recursos es un claro motivo de exclusión social, como ya se apuntó anteriormente. Fernández-Enguita (2020) en un post con un sugerente título: «Una pandemia imprevisible ha traído la brecha previsible», sugiere en él tres tipos de brechas: a) de acceso mostrando una diferencia en consecuencia entre los que tienen acceso a internet y a los recursos tecnológicos y los que no, b) de uso, en relación con la cantidad y calidad del tiempo que pudieron disponer los estudiantes de recursos tecnológicos en sus domicilio, y c) de competencia, es decir del grado de formación que tenían para utilizar desde un punto de vista educativo. Brechas que se dieron tanto en los docentes como en los estudiantes.

Otro de los aspectos que habrá de considerarse de cara al futuro, es la potenciación de espacios donde los profesores puedan acceder a contenidos de calidad, y en este sentido las instituciones educativas, deben potenciar la creación de instituciones que faciliten y ayuden a sus profesores a la producción de objetos de aprendizaje de calidad educativa y técnica que puedan ser utilizados por un amplio número de profesores. La pandemia hizo que muchos profesores buscarán en repositorios de objetos de aprendizaje, materiales que pudieran utilizar con sus estudiantes para mejorar las acciones educativas a distancia que estaban llevando a cabo con sus estudiantes. Un ejemplo de la significación de estas instituciones es el «Secretariado de Recursos Audiovisuales y Nuevas Tecnologías de la Universidad de Sevilla», sus productos audiovisuales ubicados en YouTube adquirieron un número de visitas muy significativas en los momentos de pandemia. Repercutiendo en ello, no solo en el aprovechamiento de los contenidos producidos para los estudiantes y los profesores, sino también para facilitar una imagen de calidad e internacionalización de la Universidad. Desgraciadamente, algunas instituciones crean servicios de este tipo en formato BBC (Bodas, Bautismos y Comuniones) que lo único que sirven es para seguir los actos institucionales en los cuales aparecen los responsables políticos de la Universidad, producciones, que además de ser poco observadas, tienen nulas repercusiones en la mejora educativa, presente y futura, de las instituciones educativas y al mismo tiempo tienen poca transferencia en la mejora nacional e internacional de la imagen de esas universidades.

Las TIC deben incorporarse en los planes estratégicos de las Universidades, pero no tanto como soporte para la institución, sino como extensión de la estrategias y metodología docente. Transformación digital de las Universidades que pasa por diferentes fases, que Brook y

McCormack (2020) señalan en digitalizar, digitalización y transformación digital (fig. 3).

Para finalizar otro aspecto a aprender de lo ocurrido, es que muchos docentes ante la situación producida realizaron una revisión de sus programas académicos, seleccionando aquello que consideraban fundamental en su disciplina y que debía ser adquirido por sus estudiantes. Esta revisión realizada sobre la parte del programa que se iba a impartir de forma virtual ahora debe realizarse para el conjunto del programa académico, de manera que se imparta en la docencia los contenidos que se consideran fundamentales y constituyen el «núcleo semántico de la disciplina, evitando de esta forma la sobrecarga de información y material educativo que algunas veces sometemos a los estudiantes. Esta revisión servirá al mismo tiempo para actualizar los contenidos ofrecidos a los participantes en la acción educativa. Por tanto, la revisión nos aportará dos grandes ventajas: actualización de lo más significativo y revisión científica.

BIBLIOGRAFÍA

ADITYA, D.S. (2021), Embarking Digital Learning Due to COVID-19: Are Teachers Ready? Journal of Technology and Science Education 11(1): 104-116.

ALLEN, J., ROWAN, L. & SINGH, P. (2020), Teaching and Teacher Education in the Time of COVID-19. Asia-Pacific Journal of Teacher Education 48(3): 233-236.

ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, C. & GARCÍA-PRIETO, F. (2021), Brecha digital y nuevas formas académicas en la escuela rural española durante el confinamiento. Educar 57(2): 397-411.

ÁLVAREZ-FLORES, E. & NÚÑEZ, P. (2019), Efectividad del uso de herramientas digitales en el desarrollo académico de estudiantes universitarios. In S. Amavizca Montaño (coord.), *Alfabetización Informacional para la gestión del conocimiento en la Universidad*. México: Universidad Estatal de Sonora.

BAHÇIVAN, E., GÜNEŞ, E. & ÜSTÜNDAĞ, M. (2018), A Comprehensive Model Covering Prospective Teachers' Technology Use: The Relationships among Self, Teaching and Learning Conceptions and Attitudes. Technology. Pedagogy and Education 27(4): 399-416.

BEARDSLEY, M., ALBÓ, L., ARAGÓN, P. & HERNÁNDEZ-LEO, D. (2021), Emergency Education Effects on Teacher Abilities and Motivation to Use Digital Technologies. British Journal of Educational Technology 52(4): 1455-1477.

BOSSOLASCO, M. L., CHIECHER, A. C. & DOS SANTOS, D. A. (2020), Perfiles de acceso y apropiación de TIC en ingresantes universitarios. Estudio comparativo en dos universidades públicas argentinas. Pixel-bit. Revista de Medios y Educación 57: 151-172.

BOWER, M. (2019), Technology-Mediated Learning Theory. British Journal of Educational Technology 50(3): 1035-1048.

BROOKS, CH. & MCCORMACK, M. (2020), Driving Digital Transformation in Higher Education. ECAR research report. Louisville, CO: ECAR, June 2020.

BURGOS, C., VÁZQUEZ-CANO, E., LÓPEZ-MENESES, E. & ADAOS, R. (2020), DIFPRORET PROJET: Analysis of Educational Difficulties, Proposals and Challenges Facing the COVID-19. IJERI: International Journal of Educational Research and Innovation 15: 17-34.

BURKE, P., SCHUCK, S., AUBUSSON, P., KEARNEY, M. & FRISCHKNECHT, B. (2018), Exploring Teacher Pedagogy, Stages of Concern and Accessibility as Determinants of Technology Adoption. Technology, Pedagogy and Education 27(2): 149-163.

CABERO, J. (2014), Nuevas miradas sobre las TIC aplicadas en la educación. Andalucía Educativa, 81. http://www.juntadeandalucia.es/educacion/webportal/web/revistaandalucia-educativa/en-portada/-/noticia/detalle/nuevas-miradas-sobre-lastic-aplicadas-en-la-educacion-julio-cabero-almenara-1

CABERO, J. (dir.) (2013), Redes sociales para la formación. ¿Cómo las perciben los alumnos universitarios en sus aulas? Sevilla: Grupo de Investigación Didáctica. Recuperado de: https://grupotecnologiaeducativa.es/images/LIBROS/redes2014.pdf.

CABERO, J. & BARROSO, J. (coords.) (2015), *Nuevos Retos en Tecnología Educativa*. Madrid: Síntesis.

CABERO, J. & PALACIOS, A. (2020), Marco europeo de competencia digital docente «DigCompEdu» y cuestionario «DigCompEdu Check-in». Edmetic. Revista de Educación Mediática y TIC 9(1): 213-223.

CABERO, J. & RUIZ-PALMERO, J. (2017), Las tecnologías de la información y comunicación para la inclusión: reformulando la brecha digital. International Journal of Educational Research and Innovation (IJERI) 9: 16-30.

CABERO, J., ROMERO, R., BARROSO, L. & PALACIOS, A. (2020), Marcos de competencias digitales docentes y su adecuación al profesorado universitario y no universitario. Revista Caribeña de Investigación Educativa (RECIE) 4(2): 137-158.

CABERO, J. & MARTÍNEZ, A. (2019), Las tecnologías de la información y comunicación y la formación inicial de los docentes. Modelos y competencias digitales. Profesorado. Revista de Currículum y Formación de Profesorado 23(3): 247-268.

CABERO, J. & VALENCIA, R. (2018), Teacher Education in ICT: Contributions from Different Training Models.

Revista Caribeña de Investigación Educativa (RECIE) 2(2): 61-76.

CANO, S., COLLAZOS, C., FLÓREZ-ARISTIZABAL, L., MOREIRA, F. & RAMÍREZ, M. (2020), Experiencia del aprendizaje de la Educación Superior ante los cambios a nivel mundial a causa del COVID-19. Campus Virtuales 9(2): 51-59.

CASATI, R. (2015), *Elogio del papel. Contra el colonialismo digital*. Barcelona: Ariel.

CASTELLANOS, A., SÁNCHEZ, C. & CALDERERO, J. (2017), Nuevos modelos tecnopedagógicos. Competencia digital de los alumnos universitarios. Revista Electrónica de Investigación Educativa 19(1): 1-9.

CEPAL-UNESCO (2021), La educación en tiempos de la pandemia de COVID-19, En Fundación Carolina. *La educación superior en Iberoamérica en tiempos de pandemia Impacto y respuestas docentes*, Madrid: Fundación Carolina, pp. 39-74.

DE VRIES, S., VAN DE GRIFT, W. & JANSEN, E. (2014), How Teachers' Beliefs about Learning and Teaching Relate to Their Continuing Professional Development. Teachers and Teaching: Theory and Practice 20(3): 338-357.

ELLIS, V., STEADMAN, S. & MAO, Q. (2020), Come to a Screeching Halt: Can Change in Teacher Education during the COVID-19 Pandemic Be Seen as Innovation? European Journal of Teacher Education 43(4): 559-572.

FERNÁNDEZ-ENGUITA, M. (2020), Una pandemia imprevisible ha traído la brecha previsible. https://blog.enguita.info/2020/03/una-pandemia-imprevisible-ha-traido-la.html

FUNDACIÓN TELEFÓNICA (2016), *Prepara tu escuela para la sociedad digital*. Madrid: Fundación Telefónica.

GALLARDO, E. (2012), Hablemos de estudiantes digitales y no de nativos digitales. UT. Revista de Ciències de l'educació 1: 7-21.

GARCÍA-PEÑALVO, F. *et al.* (2020), La evaluación *online* en la educación superior en tiempos de la COVID-19. Education in the Knowledge Society 21: article 12.

GARRISON, D.R. & ANDERSON, T. (2005), El *e-learning* en el siglo XXI. Barcelona: Octaedro.

GURI-ROSENBLIT, S. (2018), La enseñanza electrónica (*e-teaching*) en la educación superior: un prerrequisito esencial para el aprendizaje electrónico (*e-learning*). Journal New Approaches in Educational Research 7(2): 100-105.

HORDATT, C. & HAYNES-BROWN, T. (2021), Latin American and Caribbean Teachers' Transition to Online Teaching during the Pandemic: Challenges, Changes and Lessons Learned. Pixel-Bit. Revista de Medios y Educación 61: 131-163.

INFANTE-MORO, A., INFANTE-MORO, J. C. & GALLARDO-PÉREZ, J. (2020), Las posibilidades de empleo del internet de las cosas en el sector hotelero y sus necesidades formativas. Education In The Knowledge Society (EKS) 21: 14.

KALI, Y., SAGY, O., BENICHOU, M., ATIAS, O. & LEVIN-PELED, R. (2019), Teaching Expertise Reconsidered: The Technology, Pedagogy, Content and Space (TPeCS) Knowledge Framework. British Journal of Educational Technology 50(5): 2162-2177.

KIDD, W. & MURRAY, J. (2020), The COVID-19 Pandemic and Its Effects on Teacher Education in England: How Teacher Educators Moved Practicum Learning Online. European Journal of Teacher Education 43(4): 542-558.

LAI, K. & BONG, K. (2015), Technology Use and Learning Characteristics of Students in Higher Education: Do Generational Differences Exist? British Journal of Educational Technology 46(4): 725-738.

MAGEN-NAGAR, N. & MASKIT, D. (2016), Integrating ICT in Teacher Colleges – A Change Process. Journal of Information Technology Education: Research 15: 211-232.

MAILE, R., MENA, J. & FEINAUER, E. (2020), Faculty Readiness for Online Crisis Teaching: Transitioning to Online Teaching during the COVID-19 Pandemic. European Journal of Teacher Education 43(4): 523-541.

MISHRA, P. & KOEHLER, M. J. (2006), Technological Pedagogical Content Knowledge: A Framework for Teacher Knowledge. The Teachers College Record 108(6): 1017-1054.

MOROCHO, M. E. (2021), *El Aseguramiento de la Calidad de la Educación Superior en Latinoamérica y el Caribe, en tiempos del COVID-19: Visión de las Instituciones de Educación Superior. Instituto Latinoamericano y del Caribe de Calidad en Educación Superior a Distancia (CALED-Ecuador)*, Loja: Universidad Técnica Particular de Loja. http://www.caled-ead.org/sites/default/files/Libro-Instituciones-ES.pdf

MOROZOV, E. (2015), *La locura del solucionismo tecnológico*. Madrid: Kartz editores.

NAVARRO-ESPINOSA, J. A., VAQUERO-ABELLÁN M., PEREA-MORENO A. J., PEDRÓS-PÉREZ G., APARICIO-MARTÍNEZ P. & MARTÍNEZ-JIMÉNEZ M. P. (2021), The Higher Education Sustainability before and during the COVID-19 Pandemic: A Spanish and Ecuadorian Case. Sustainability 13(11): 6363.

PARODI, G., MORENO DE LEÓN, T., JULIO, C. & BURDILES, G. (2019), Generación Google o Generación Gutenberg: hábitos y propósitos de lectura en estudiantes universitarios chilenos. Comunicar 58: 85-94.

PEDRÓ, F. (2021), COVID-19 y educación superior en América Latina y el Caribe: efectos, impactos y recomendaciones políticas, en VV.AA., *La educación superior en Iberoamérica en tiempos de pandemia Impacto y respuestas docentes*, Madrid: Fundación Carolina, 23-37.

PINTO, A., CORTÉS, O. & ALFARO, C. (2017), Hacia la transformación de la práctica docente: modelo espiral de competencias TIC TAC TEP. Pixel-bit. Revista de Medios y Educación 51: 37-51.

PRENSKY, M. (2011), *Enseñar a nativos digitales*. Madrid: SM.

PRESTRIDGE, S. (2017), Examining the Shaping of Teachers' Pedagogical Orientation for the Use of Technology. Technology, Pedagogy and Education 26(4): 367-381.

RAPPOPORT, S., RODRÍGUEZ, M.S. & BRESANELLO, M. (2020), *Enseñar en tiempos de COVID-19 Una guía teórico-práctica para docentes*. Montevideo: Unesco.

ROMERO-TENA, R., BARRAGÁN-SÁNCHEZ, R., LLORENTE-CEJUDO, C. & PALACIOS-RODRÍGUEZ, A. (2020), The Challenge of Initial Training for Early Childhood Teachers. A Cross Sectional Study of Their Digital Competences. Sustainability 12: 4782.

RYAN, T. (2021), Designing Video Feedback to Support the Socioemotional Aspects of Online Learning. Education Technology Research Development 69: 137-140.

SALOMON, G. (1983), The Differential Investment of Mental Effort in Learning from Different Sources. Educational Psychologist 18(1): 42-50.

SALOMON, G. (1984), Television Is «Easy» and Print Is «Tough»: The Differential Investment of Mental Effort in Learning as a Function of Perceptions and Attributions. Journal of Educational Psychology 76(4): 647-658.

SAMANIEGO, G., MARQUÉS, L. & GISBERT, M. (2015), El profesorado universitario y el uso de entornos virtuales de aprendizaje. Campus Virtuales 4(2): 50-58.

SCHLEICHER, A. (2020), The Impact of COVID-19 on Education Insights from Education at a Glance 2020. OECD Secretariat for the European Union. https://www.oecd.org/education/the-impact-of-covid-19-on-education-insights-education-at-a-glance-2020.pdf

SCULLY, D., LEHANE, P. & SCULLY, C. (2021), It Is No Longer Scary': Digital Learning before and during the COVID-19 Pandemic in Irish Secondary Schools. Technology, Pedagogy and Education 30(1): 159-181.

SHAH, M. & CHENG, M. (2018), Exploring Factors Impacting Student Engagement in Open Access Courses. Open Learning: The Journal of Open. Distance and e-Learning, 1-16.

SMITH, SH. & XU, D. (2016), How Do Online Course Design Features Influence Student Performance? Computers & Education 95: 270-284.

SORGO, A., BARTOL, TH., DOLNICAR, D. & BOH, B. (2017), Attributes of Digital Natives as Predictors of Information Literacy in Higher Education. British Journal of Educational Technology 48(3): 749-767.

SOSA, A., SALINAS, J. & DE BENITO, B. (2018), Las tecnologías emergentes en las actividades de aprendizaje al implementar un modelo de incorporación de tecnología en el aula. European Journal of Education Studies 4(1): 155-173.

TORRES-DIAZ, J. C., GOMEZ, H., ARIAS, S., INFANTE MORO, A., DE CASTRO LOZANO, C. & TORRES, S. (2015), Social Learning Environments. In International Conference on Interactive Collaborative Learning (ICL); pp. 128-131.

TRUJILLO, F. (2021), *The School Year 2020-2021 in Spain during the Pandemic*. Publications Office of the European Union, Luxembourg.

UNESCO (2017), *Sociedad digital: brechas y retos para la inclusión digital en América Latina y el Caribe*. Montevideo: Unesco.

VÁZQUEZ-CANO, E., GÓMEZ-GALÁN, J., INFANTE-MORO, A. & LÓPEZ-MENESES, E. (2020), Incidence of a Non-Sustainability Use of Technology on Students' Reading Performance in Pisa. Sustainability 12(2): 749.

WANG, SH., HSU, H., CAMPBELL, T., COSTER D. & LONGHURST, M. (2014), An Investigation of Middle School Science Teachers and Students Use of Technology inside and outside of Classrooms: Considering Whether Digital Natives Are More Technology Savvy than Their Teachers. Educational Technology Research Development 62: 637-662.

YATES, A., STARKEY, L., EGERTON, B. & FLUEGGEN, F. (2021), High School Students' Experience of Online Learning during COVID-19: The Influence of Technology and Pedagogy. Technology, Pedagogy and Education 30(1): 59-73.

Capítulo XIII
La alarma vs. legislación ordinaria contra pandemias en perspectiva comparada

Javier Barnés
Catedrático de Derecho Administrativo de la Universidad Pompeu Fabra.
Exletrado del Tribunal Constitucional

PREÁMBULO

El principio de legalidad significa que el Parlamento debe enfrentarse directamente a lo que hace y asumir el coste político que ello implica. En ese sentido, los derechos fundamentales no pueden ser ignorados mediante palabras generales o ambiguas. Y ello se debe a que es muy alto el riesgo de que las consecuencias de una previsión inespecífica y no delimitada pasen inadvertidas en el proceso democrático. Por tanto, a falta de una previsión expresa o de una implicación necesaria en sentido contrario, los tribunales presumirán que hasta las más genéricas expresiones de la ley nacen con la intención de estar sujetas y subordinadas a los derechos fundamentales del individuo. De este modo, los tribunales del Reino Unido, aunque reconocen la soberanía del Parlamento, siguen este principio constitucional no escrito que poco se diferencia de los Estados dotados de Constitución escrita (*House of Lords*)[1].

En España, el debate jurídico sobre la respuesta jurídica al COVID-19 ha gravitado en buena medida en torno a la habilitación para restringir derechos fundamentales[2], esto es, se ha situado en el primer escalón o fase de las cuestiones a resolver[3]. En ese contexto se ha discutido el uso alternativo de la declaración de alarma y la legislación sanitaria, es decir, entre una modalidad de derecho extraordinario (art. 116.2 CE) y unos (escasos) preceptos legales previstos con carácter ordinario para la lucha contra las enfermedades infecciosas[4].

En realidad, y más allá de la superficie de esa polémica, lo que subyace en última instancia es una muy diversa comprensión de la función del parlamento –en

1. *Cf.* Lord Hoffmann, en *R v Secretary of State for the Home Department, ex parte Simms* [1999] UKHL 33. Se trata de un caso constitucional en Gran Bretaña, concerniente a la soberanía del parlamento y el principio de legalidad en relación con los derechos fundamentales. Se ofrece una traducción literaria, no literal, y resumida, aunque fiel a la argumentación.
Expresado en términos generales: es doctrina común que los poderes de emergencia capaces de restringir los derechos fundamentales –con alcance singular o general– han de estar atribuidos expresa y específicamente en la ley.
Para la interpretación de esta doctrina, a propósito de la lucha contra la pandemia, baste la remisión a la conferencia de Lord Sumption, profesor emérito y antiguo magistrado de la *Supreme Court of the United Kingdom*, «Government by decree – COVID-19 and the Constitution», pronunciada el 27 de octubre de 2020 (disponible en YouTube: https://www.youtube.com/watch?v=amDv2gk8aa0, última visita junio 2021, que sirve de la misma cita que figura en el texto).
Téngase en cuenta que esta conocida doctrina –considerada la mejor formulación del principio de legalidad en la materia– ha sido recordada en Reino Unido en relación con un precepto –el art. 45C(1) de la Ley de 1984–, más concreto que los nuestros (nota 10), para concluir que no puede habilitar un confinamiento generalizado de personas sanas, sin una expresa, ponderada, matizada y entallada autorización legislativa.
2. Alarma, excepción, legislación ordinaria en materia de salud pública.
3. Fuera de ese debate han quedado de ordinario otros impactos, como pueden ser la alteración de las fuentes del derecho a consecuencia del recurso a normas extraparlamentarias que desplazan a las leyes, o del orden de distribución de competencias. Igualmente, y en relación con los mismos derechos fundamentales, ha quedado fuera de ese debate un tema crucial, en el que aquí se insiste, cual es la regulación legislativa acerca del quién, del qué, del cuándo y del cómo de esas restricciones, así como de los correspondientes controles y garantías.
4. Excede de nuestro objeto de análisis el estado de excepción y de la jurisprudencia recaída sobre este extremo. Igualmente, no forman parte de nuestro estudio, centrado en la función de la ley como expresión de la democracia parlamentaria, los excesos en que en tantos sistemas se ha podido incurrir en la respuesta al COVID-19 a manos de los respectivos Gobiernos.

primer lugar, de las Cortes Generales– y, con ella, de la democracia parlamentaria. Es la hora del Ejecutivo. Pero ¿cuál es el papel de las Cortes Generales (y de los demás parlamentos)? ¿Qué reclaman el principio de legalidad y la reserva de ley respecto de la acción del Ejecutivo y de las Administraciones en tiempos de pandemia, *a la vista de las características actuaciones extraordinarias* que su combate requiere?

La cuestión no termina, sin embargo, con la mera *habilitación legislativa* (cómo dar la luz verde al Ejecutivo), sino que se extiende inescindiblemente al *marco* o *regulación legal* en que esa acción ha de moverse en la lucha contra la pandemia (concedido el permiso, qué directrices o referentes de carácter sustantivo, organizativo y procedimental ha de establecer la ley para guiar la acción del Ejecutivo).

Los problemas aquí relacionados con el principio de legalidad y reserva de ley son, pues, primero, la cobertura o *habilitación* legal requiere que el Ejecutivo para actuar en tiempos de crisis, señaladamente en el ejercicio de potestades *extraordinarias*; segundo, el *marco legal* en que tales poderes se despliegan, puesto que no se le otorga un cheque en blanco; y, tercero, los *controles políticos* en sede parlamentaria y *judiciales*.

Adelantamos que el presente trabajo sostiene en primer término la radical insuficiencia de la *legislación ordinaria* en materia de salud pública en vigor para satisfacer las exigencias del principio de legalidad y de la reserva de ley en la lucha contra la pandemia en esta triple dimensión. Tal insuficiencia es evidente desde luego para legitimar el ejercicio *de facto* de potestades *extraordinarias* y sobre cuyo contenido habrá ocasión de abundar. Pero no lo es menos cuando se trata de ejercer potestades *ordinarias* cuya autorización y regulación han de contar asimismo con una clara base legislativa. Y en segundo término se advierte que, aún con la autorización que otorga la declaración de alarma para ejercer potestades extraordinarias, la inexistencia de una ley general contra las enfermedades infecciosas genera problemas adicionales. Quién debe decir qué. De eso se trata. No se discute aquí cuál sea el contenido del derecho en la lucha contra la pandemia, sino de quién debe decidir lo que ha de ser el derecho.

En este contexto, la mirada comparada contribuye a esclarecer el debate. A este propósito pone el punto de mira precisamente en el entendimiento del *principio de legalidad* y de la *reserva de ley* en países de referencia, y, por tanto, en la función ejercida por el poder legislativo en la lucha contra el COVID-19 (III). Se alude con mayor detalle a los modelos británico y alemán. Y ello no ya solo por su interés en cuanto fuente de inspiración para nuestra necesaria ley contra las enfermedades contagiosas o infecciosas, sino también porque han sido invocados erróneamente en el debate nacional para sugerir que contaríamos con una legislación análoga a la de estos países y justificar así el recurso a los preceptos, muy cortos y exiguos al margen de obsoletos[5], de nuestra legislación sanitaria[6]. Elevada la mirada comparada por encima de la pluralidad de instrumentos nacionales o de las connaturales singularidades de las respectivas estructuras constitucionales, resulta más fácil apreciar la función que cumple la ley parlamentaria en la lucha contra el COVID-19 en estos ordenamientos[7].

Con carácter previo, parece oportuno hacer unas distinciones elementales sobre la acción administrativa en materia de salud pública (I) y la función legislativa que corresponde a las Cortes Generales desarrollar en cada caso (II).

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El punto de partida en el ordenamiento español en la lucha contra el COVID-19. Estado de alarma y legislación sanitaria

Como se ha notado, el debate habido en nuestro caso entre «declaración de alarma» y «legislación sanitaria»[8] se ha centrado en primer término en la *cobertura formal* de las medidas del Ejecutivo y de la Administración en la lucha contra el COVID-19: si solo tienen amparo en la *previa declaración del estado de alarma* (art. 116 CE y Ley Orgánica 4/1981, de 1 de junio, de los estados de alarma, excepción y sitio, en adelante LOAES), o también, y para análogas restricciones, en ciertos preceptos de la *legislación sanitaria*, sin necesidad de esa declaración.

1.2. Sentido y alcance de la alarma y de la legislación sanitaria. Una observación preliminar

A nuestro limitado propósito, conviene destacar somera y descriptivamente algunas notas propias de una y otra fórmula.

5. I.4.d), IV.1 y 2.
6. A título anecdótico, porque la cuestión no es de cantidad, baste pensar que no son comparables unas pocas líneas genéricas de algún precepto legal asilado, como es aquí el caso, con leyes generales con decenas o centenares de páginas sobre la materia. Como tampoco es comparable la constante reforma en sede parlamentaria en estos países de su ya completa legislación contra el COVID-19, con la absoluta inactividad legislativa de las Cortes Generales en la materia. Véase *infra* núm. III y IV.
7. III.
8. Lo que interesa aquí es la visión de conjunto de los efectos que una legislación insuficiente de esta naturaleza produce, así como su dimensión constitucional y comparada, teniendo en cuenta el telón de fondo de la crisis de la democracia parlamentaria (I.1.3, I.2 y V).

1.2.1. Sobre la declaración de alarma

La declaración de alarma representa un instrumento que pretende gestionar la imprevisibilidad y la incertidumbre en supuestos excepcionales (desde la erupción de un volcán, pasando por la afectación grave de un servicio público esencial, hasta una epidemia). Se trata, y ello es relevante notarlo, de un mecanismo idealmente limitado en el tiempo y en el espacio. No parece desde luego concebido para regular de modo indefinido una situación excepcional, para realizar una política de Estado a lo largo del tiempo, pasadas los primeros días o semanas de incertidumbre, máxime si se tiene en cuenta, entre otras consideraciones no menores, que el derecho extraordinario que el Gobierno emana al amparo de la alarma es susceptible de desplazar a las leyes, es decir, al derecho ordinario, además de afectar a principios constitucionales estructurales como el principio democrático o la división de poderes. La alarma constituye una anomalía –una alteración del sistema– que como tal no puede perdurar en el tiempo. Así lo reconoce de modo implícito la propia Ley que regula los supuestos en que cabe invocarla (art. 4 LOAES) y se infiere de la Constitución (arts. 51, 55, 116), pues está en la «naturaleza de las cosas».

Por otra parte, la LOAES, en su redacción en vigor, se limita a habilitar al Gobierno para activar potestades extraordinarias (art. 7), pero no regula por sí misma el régimen legal de cada uno de los supuestos que puedan justificar la declaración. Nada se dice sobre qué hacer en caso de catástrofes, crisis sanitaria, paralización de servicios públicos esenciales o situaciones de desabastecimiento de productos de primera necesidad (art. 4 LOAES). Silencio que, hasta cierto punto, se corresponde con el carácter de este instrumento de derecho extraordinario, proyectado para la gestión provisional y condicionada de algo excepcional, que es a su vez imprevisible e incierto.

Que la LOAES carezca de contenido sustantivo –esto es, de un régimen jurídico mínimo relativo a esos supuestos y, en lo que ahora importa, a la lucha contra la enfermedad– trae consigo dos consecuencias inmediatas: la primera es que, a falta de directrices legislativas específicas, el Gobierno habrá de «inventar» –durante el estado de alarma– para cada día las medidas que haya que adoptar, en lugar de «aplicar» o «elegir» entre una variedad de medidas reguladas por ley. La norma es la del Ejecutivo, no la crea el parlamento. Es una norma extraparlamentaria y no aplicativa o implementadora de una ley. La segunda consecuencia es que el control jurídico –de contraste entre lo dispuesto en una ley y su aplicación– desaparece en ausencia de ley, puesto que las medidas del Ejecutivo nacen de sí mismo –aunque sujetas desde luego a la Constitución–, y no derivan de una ley que establezca el elenco o el marco de lo que cabe o no hacer, así como sus condiciones. En otras palabras, el estado de alarma, tal como está regulada en la LOAES, esto es, sin contener en sí el régimen legal de la lucha contra la enfermedad y, lo que sería aún más natural, sin conexión con una ley externa sobre la materia –una ley de pandemias–, no ofrece guía o referente para la acción del Ejecutivo, ni tampoco para el control judicial (más allá del control de constitucionalidad). Queda tan solo el control político que quepa ejercer en las prórrogas.

La perduración del estado de alarma a resultas de ese dato –la inexistencia de una ley de pandemias a la que pueda vincularse para el ejercicio de potestades extraordinarias–, y de sus consecuencias –la ley material para cada tiempo y lugar queda en manos del Gobierno–, no resulta sostenible, si se considera, primero, que el factor sorpresa (la impredecibilidad del supuesto extraordinario) se desvanece y, segundo, que la gestión de la incertidumbre acerca de las medidas posibles a adoptar desaparecen progresivamente con el transcurso del tiempo. La palabra la tiene el parlamento. El hecho es que cuando se declara la pandemia, en el mismo mes de marzo de 2020, no son pocos los países que aprueban las primeras leyes parlamentarias contra el COVID-19, disponiendo ya el repertorio de medidas que cabrá tomar en función de las circunstancias. Se sabe ya en esa fecha en buena medida cuáles serán las armas jurídicas que habrá que emplear y se llevan a las leyes. No se sabe, en cambio, por cuánto tiempo o en qué medida. Lo que explica las sucesivas reformas legales en los respectivos parlamentos (*infra* III). Pero mantener a un Ejecutivo con una declaración de alarma, con los poderes que ello entraña, desvinculado de una ley general que enmarque su actuación, plantea no pocos problemas constitucionales, habida cuenta de la excepcionalidad que entraña el derecho extraordinario.

En cambio, la aprobación en España de una ley general contra las enfermedades infecciosas –comprensiva de las especialidades derivadas del COVID-19– o, si se prefiere, de una ley específica contra esta pandemia, en la que en todo caso se regularan las potestades ordinarias y extraordinarias que al Ejecutivo le incumbe establecer en los términos exigibles por el principio de legalidad y de la reserva de ley, habría alejado del estado de alarma –necesario en todo caso para el ejercicio de las potestades extraordinarias– las referidas objeciones.

1.2.2. Sobre la legislación sanitaria en vigor

Al cesar el estado de alarma, el Ejecutivo queda sin cobertura para ejercer las potestades (extraordinarias) que solo caben al amparo del art. 116 CE y de la LOAES. No se pueden tomar medidas análogas o aún más gravosas

sobre los derechos y libertades fuera del estado de alarma. Tampoco se puede alterar el sistema competencial. Ni los reglamentos sanitarios puedan oponerse a las leyes. La cesación del estado de alarma presupone que ya no son posibles medidas de esa naturaleza, sino aquellas otras previstas en la legislación ordinaria.

A falta de una ley general de pandemias o de lucha contra las enfermedades contagiosas o infecciosas en nuestro ordenamiento que regule con la extensión e intensidad exigibles, no cabe sino aplicar los pocos preceptos legales que alguna relación guardan con la materia, pero que, como se abundará, no permiten ir muy lejos[9].

En efecto, la legislación sanitaria vigente –simbolizada en el art. 3 de la Ley Orgánica 3/1986, de 14 de abril, de Medidas Especiales en Materia de Salud Pública (en adelante, Ley 3/1986), y completada por dos preceptos de cabecera más[10]– no brinda cobertura al ejercicio de *poderes de emergencia extraordinarios*, sino tan solo a *ciertas medidas sanitarias de ordinaria administración*[11], y por tanto incapaces para legitimar la mayor parte de las medidas que la lucha contra la pandemia ha requerido y de las que se ha hecho uso en el período posalarma[12].

Se trata, por lo demás, de unos preceptos legales obsoletos, exiguos y minimalistas[13], concebidos según su tenor literal e histórico para actuaciones menores, señaladamente para intervenciones *singulares* sobre personas *contagiadas* o sospechosas de estarlo, y no para operaciones *masivas* de prevención dirigidas a personas *sanas* de toda la región o el país. No son, no equivalen a, una ley contra las enfermedades infecciosas.

1.3. Una nota común a ambas opciones: la falta de reforma legislativa desde la irrupción de la pandemia y sus consecuencias. El problema de la ausencia de una ley general contra enfermedades infecciosas

Ninguna operación –reforma de la LOAES y/o actualización de la legislación sanitaria contra el COVID-19– se ha emprendido en la Cortes Generales. La solución más simple en nuestra estructura constitucional hubiera consistido, como se ha notado, en aprobar una ley contra las enfermedades infecciosas, dirigida particularmente contra el COVID-19, y en la que se distinguiera entre potestades extraordinarias, cuya activación correspondería a la declaración de alarma (activación por tanto temporal, con fecha de caducidad de las normas aprobadas a su amparo, y controlables por las Cortes), y potestades ordinarias, para actuaciones menores, y que podrían desarrollarse sin la necesidad de tal declaración (*infra* 4).

El hecho de que nuestro ordenamiento jurídico carezca de una *ley general contra las enfermedades infecciosas* en la que, de un lado, la acción administrativa pueda hallar parámetros materiales, organizativos y procedimentales, y, de otro, el parlamento y los jueces criterios de control, genera, pues, problemas relacionados: a) en los períodos cubiertos por el estado de alarma, la ausencia de una ley a la que remitirse (art. 12.1 LOAES) obliga al Ejecutivo a «inventar» para cada tiempo y lugar las medidas *extraordinarias* adecuadas; y b) y en los períodos no cubiertos, tal ausencia apenas permite ejercer algunas potestades *ordinarias* frente al COVID-19, ya que, como habrá ocasión de insistir[14], el art. 3 de la Ley 3/1986), por sí mismo no prevé expresas restricciones sobre derechos fundamentales, ni, menos aún, para toda la población.

9. *Infra* IV.

10. Recuérdese que el referido precepto dispone: «Con el fin de controlar las enfermedades transmisibles, la autoridad sanitaria, además de realizar las acciones preventivas generales, podrá adoptar las medidas oportunas para el control de los enfermos, de las personas que estén o hayan estado en contacto con los mismos y del medio ambiente inmediato, así como las que se consideren necesarias en caso de riesgo de carácter transmisible».
A este precepto se suman el art. 26 de la Ley 14/1986, y el art. 54 de la Ley 33/2011, cuyas previsiones –interpretadas de forma literal, sistemática, finalista, histórica y a la luz de la *mens legislatoris*– se mueven en la lógica tradicional, a saber: actuaciones limitadas en el tiempo y en el espacio, dirigidas esencialmente frente a personas contagiadas o sospechosas de estarlo, a cosas e instalaciones relacionadas (el art. 3 Ley 3/1986 habla por ello de «control de los enfermos» y de las personas que han estado en contacto). Se sitúan estas leyes en el ámbito de las potestades ordinarias y, como se desprende con naturalidad de su tenor literal, no autorizan a alterar el sistema de fuentes, el orden competencial, ni confinamientos preventivos de toda la población, lo que incluye obviamente a la sana.
Téngase en cuenta que el precitado art. 26 de la Ley 14/1986 alude a medidas preventivas, tales como la incautación o inmovilización de productos, suspensión del ejercicio de actividades, cierres de empresas o sus instalaciones, o intervención de medios materiales y personales. Por su parte, el art. 54 de la Ley 33/2011, hace referencia a medidas tales como la inmovilización y, si procede, el decomiso de productos y sustancias; la intervención de medios materiales o personales; el cierre preventivo de las instalaciones, establecimientos, servicios e industrias; la suspensión del ejercicio de actividades; la determinación de condiciones previas en cualquier fase de la fabricación o comercialización de productos y sustancias, así como del funcionamiento de las instalaciones, establecimientos, servicios e industrias a que se refiere esta ley.

11. El art. 3 Ley 3/1986 por sí mismo no da cobertura propiamente tampoco a restricciones singulares, si no es en relación con los escasos supuestos que contemplan las normas citadas en el segundo párrafo de la nota anterior. Tal precepto no suma, ni añade nada (véase IV.1). En contra la jurisprudencia del Tribunal Supremo (IV.2).

12. Para mayor abundamiento, *infra* núm. IV.

13. A título anecdótico, nótese que en una de esas leyes –en vigor–, la Ley 14/1986, General de Sanidad, se prevé la aprobación de un texto refundido, nunca realizada, en el que las normas a refundir sobre enfermedades infecciosas en buena medida se hallarían en la Ley de bases de 1944 (*cf*. Disposición final quinta).

14. *Infra* IV.

De ahí se derivan dos problemas, de raíz común. De un lado, la utilización continuada en el tiempo de la declaración de alarma, por las razones antedichas, supone un claro abuso y desbordamiento de este instrumento, puesto que la posibilidad real de aprobar en el parlamento las medidas legales a adoptar hace perder progresivamente la justificación de un derecho extraordinario *al margen del parlamento* (2.a). No es lo mismo, en efecto, mantener la declaración de alarma, pero conectada a una ley que regule la lucha contra el COVID-19 en lo que se refiere al ejercicio de potestades extraordinarias, que una alarma que deje indefinidamente completa libertad al Ejecutivo, y cuyo control apenas resulte enjuiciable en términos jurídicos (*infra* III).

De otro, en los períodos de posalarma o «entre alarmas», el recurso a los referidos preceptos de la legislación sanitaria (2.b), incapaces de soportar el impacto que suponen las medidas contra la pandemia, suscita como se verá serias cuestiones constitucionales[15], en primer lugar, la quiebra del *principio de legalidad*[16] con lo que ello significa (fortalecido en los aspectos que ahora se tratan por la *reserva de ley*)[17].

El combinado de «declaración *formal* del estado de alarma» para justificar el ejercicio temporal de potestades extraordinarias, por un lado y, por otro y vinculada a aquella, el recurso a la «legislación *general* contra las enfermedades infecciosas» (art. 12.1 LOAES) no solo constituye la experiencia de otros ordenamientos, sino que encaja en nuestro sistema. En esa dirección, en efecto, apuntaba tímidamente la LOAES en 1981 cuando preveía que la alarma podría llevar consigo la remisión a «normas para la lucha contra las enfermedades infecciosas»[18], si bien desde esa fecha las sucesivas legislaturas se han desentendido de aprobar una ley en tal sentido, preocupándose *en exceso* por la organización del sistema y la distribución de competencias *en detrimento* de la regulación de las medidas específicas para combatir tales enfermedades, y, en *concreto, con un claro abandono de la incidencia sobre los derechos y libertades* en estas situaciones, de los procedimientos para aprobar las restricciones y sus límites, o de las alteraciones del sistema de fuentes, entre otros elementos capitales y característicos[19]. Abierta dejación que, sin embargo, debía haber sido compensada, una vez constatada la ausencia de una infraestructura legal contra el COVID-19[20].

15. *Infra* IV.
16. Arts. 1.1, 9.1, 53.1, 97 *in fine*, 103.1 *in fine* CE. (véase nota siguiente).
17. Arts. 1.1 (principio democrático y principio de Estado de derecho), 53.1, 81, 116 CE.
18. Art. 12.1.
19. Basta la lectura de las tres leyes de cabecera antes enunciadas para comprobarlo. Véase nota 10.
20. *Infra* II y IV.

1.4. Algunas precisiones previas sobre potestades ordinarias y extraordinarias del ejecutivo y de las administraciones en la lucha contra la pandemia

Como se ha anticipado, la obligada acción legislativa del parlamento –en primer lugar, de las Cortes, en nuestro caso–, si es que resulta necesario probarla, se hace patente a la luz de las siguientes nociones o supuestos básicos, que se traen aquí a modo de glosario introductorio:

1.4.1. La diferenciación entre emergencia ordinaria y emergencia extraordinaria

Se debe discriminar de entrada entre lo que aquí llamamos –a efectos expositivos– la «emergencia extraordinaria» y la «emergencia ordinaria» o de «ordinaria administración».

Por decirlo en términos epidemiológicos: no es lo mismo una epidemia de gripe estacional o de tifus, que el COVID-19; o el confinamiento de pequeñas comunidades para «el control de los enfermos, de las personas que estén o hayan estado en contacto con los mismos y del medio ambiente inmediato»[21], que el confinamiento generalizado de la población de un país con carácter preventivo. Mientras la primera se puede enfrentar en principio con poderes ordinarios (y en aplicación de leyes ordinarias)[22], la segunda altera por completo la vida del Estado y de la sociedad, y exige la activación de poderes extraordinarios en favor del Ejecutivo con las máximas garantías e intervención parlamentaria.

El derecho no es, no puede ser, el mismo para ambos supuestos por razones elementales. A la primera situación por justa convención la llamamos aquí derecho ordinario y a la segunda derecho extraordinario. Para entendernos, algunos preceptos de la legislación sanitaria antes citados pertenecerían al primer grupo[23]; y el art. 116 CE, al segundo. El derecho extraordinario (art. 116 CE) es subsidiario del derecho ordinario[24]. Como en otros ordenamientos, el recurso al derecho extraordinario requiere una declaración especial (del Gobierno y/o del parlamento)[25];

21. Art. 3 Ley 3/1986.
22. IV.1 y 2.
23. *Supra* nota 10.
24. Si son suficientes el derecho y los poderes ordinarios en la lucha contra la enfermedad infecciosa, no procederá acudir al estado de alarma. En sentido análogo, en este punto, el dictamen del Consejo de Estado 213/2021, de 22 de marzo, sobre recurso de inconstitucionalidad contra determinados preceptos de la Ley de la Comunidad Autónoma de Galicia 8/2021, de Salud, núm. IV.
Más proscrita aún si cabe queda la situación contraria: ejercer poderes extraordinarios con la pretendida cobertura del derecho ordinario, que es lo sucedido en nuestro caso: *Infra* IV.
25. *Infra* III.

la aplicación del derecho ordinario, no. En todo caso, la *ley* habrá de regular *ambos regímenes jurídicos*, con sus respectivas garantías[26].

1.4.2. La correspondiente delimitación entre potestades ordinarias y potestades extraordinarias

Consecuentemente, ha de distinguirse entre una eventual actuación, limitada en el tiempo y en el espacio contra una enfermedad infecciosa que habitualmente reclame el ejercicio de potestades ordinarias[27], y una política de Estado que afecte, nótese bien, a la libertad en general y a los derechos fundamentales[28], al sistema de fuentes[29] y al orden de distribución de competencias[30], así como a otros efectos económicos, sociales y políticos de calado, lo que requiere el ejercicio de potestades extraordinarias *ex art.* 116 CE. Baste notar que el reglamento de emergencia extraordinaria puede afectar a los derechos fundamentales, desplazar a las leyes, modificar la organización administrativa y el orden de distribución de competencias, sustrayéndose además en su elaboración a las normas del procedimiento ordinario[31].

Es esta una clave fundamental desde la que valorar tantas cuestiones[32]. Sea como fuere, las potestades ordinarias y las extraordinarias –estas de modo reforzado y con una participación especial del parlamento para su activación temporal y su seguimiento– han de establecerse *mediante ley formal*.

1.4.3. La distinción entre restricciones singulares y restricciones de carácter general, entre el control de enfermos y el control de personas sanas

Con frecuencia, las medidas singulares –dirigidas a un grupo determinado de individuos– implican el ejercicio de potestades ordinarias, mientras que las medidas de alcance general se corresponden con el desempeño de potestades extraordinarias. Las singulares típicamente se proyectan de ordinario sobre personas contagiadas o sospechosas de estarlo; las generales, en cambio, de modo característico, pueden tener carácter preventivo y pueden afectar a personas sanas. No se trata, sin embargo, de una ecuación perfecta. De entrada, el binomio «medida singular-medida general» no equivale siempre al binomio «potestad ordinaria-potestad extraordinaria»[33]. El deslinde entre la potestad ordinaria y la extraordinaria en última instancia no se deriva automáticamente del dato formal de la individualidad o de la generalidad de la injerencia, sino de la materialidad de los poderes *efectivamente* atribuidos en los términos antes indicados[34].

En todo caso, las restricciones singulares y las restricciones generales –sean expresión de potestad ordinaria o extraordinaria– han de tener su *base* y *regulación* en la *ley*.

26. Notas 16-17. *Infra* III-V.

27. Véanse los ejemplos del art. 54 de la Ley 33/2011 (nota 10).

28. Constituye el aspecto más visible y conocido. La pérdida no se produce solo a consecuencia de las limitaciones, restricciones graves o eventuales suspensiones de los derechos fundamentales –la joya de la corona– sean estas a título individual o generalizado, sino de otros muchos derechos –la mayoría– de configuración legal. No es solo fruto de restricciones episódicas o puntuales, sino en ocasiones sistémicas y de larga duración. No se genera solo a resultas de una acción positiva (exceso), sino también de una insuficiente protección de ciertos derechos (defecto), como puede ser el derecho a la vida y a la integridad física y moral de todos, cualquiera que sea la edad y las circunstancias; o porque sea inadecuada la compensación arbitrada por la paralización de actividades económicas. O porque se active un régimen específico y distinto de un derecho fundamental –una nueva regulación–, como el de la protección de datos.

29. Así se ha producido en nuestro caso, también fuera de la cobertura de la declaración de alarma. Sobre la expresa previsión de los efectos de los reglamentos sanitarios excepcionales en el panorama comparado véase más abajo núm. III.

30. P. ej.: desde el establecimiento de nuevas formas de coordinación o la eventual unidad de mando, pasando por la asunción de competencias locales por la instancia superior, hasta la creación de nuevas organizaciones, o la expansión horizontal de la competencia de salud pública.

31. Por ejemplo, el art. 2.3 del Real Decreto 926/2020, de 25 de octubre, declarando el estado de alarma, establecía que «las autoridades competentes delegadas quedan habilitadas para dictar, por delegación del Gobierno de la Nación, las órdenes, resoluciones y disposiciones para la aplicación de lo previsto en los arts. 5 a 11. Para ello, no será precisa la tramitación de procedimiento administrativo alguno» (*sic*). No disponía, como se han cuidado de prever con detalle las leyes a que se hace referencia en el análisis comparado (núm. III), procedimiento alternativo alguno, pese a los formidables efectos que estos reglamentos pueden irrogar.
En nuestro caso, pues, y por decirlo con mayor precisión, no es que las normas ordinarias de elaboración –naturalmente– hayan de verse sustituidas durante la emergencia por otras extraordinarias. Es, más sencillamente, que se suprime lisa y llanamente toda regulación relativa a la elaboración de estas normas extraparlamentarias sin alternativa alguna, atribuyendo así un poder enorme sin control, ni garantía algunos.

32. Desde la prórroga de la alarma, hasta la viabilidad jurídica de los pocos preceptos de la legislación sanitaria existentes contra las enfermedades infecciosas, desde la transparencia administrativa hasta el control parlamentario, desde la previsión legislativa acerca de los referendos o elecciones pendientes hasta las ayudas económicas y sociales. Estas y otras cuestiones han de ser valoradas al trasluz de ese impacto de los reglamentos de emergencia extraordinaria. Véase también III.

33. Por ejemplo, un precepto legal que regulara el cierre preventivo de instalaciones a consecuencia de una infección podría ser eventualmente implementado mediante reglamento (*ejecutivo*), con completa subordinación a la ley (y siempre que ésta hubiera agotado la materia y habilitara el desarrollo reglamentario). Y en tal caso se trataría de reglamentos ordinarios, dirigidos a una pluralidad indeterminada de personas, en ejercicio de una potestad ordinaria, si bien limitados a desarrollar un precepto legal acotado. En cambio, un reglamento de emergencia sanitaria que pretenda desplazar a una ley –aun cuando no incida propiamente sobre un derecho fundamental– solo puede dictarse en ejercicio de potestades extraordinarias. Véase III.2.2 y nota 161.

34. Núm. I y nota anterior.

1.4.4. La delimitación entre la actividad administrativa de policía sanitaria y los poderes de emergencia extraordinaria; entre la praxis de la legislación histórica de salud pública y las exigencias del Estado constitucional de derecho

Una cosa es la normal actividad administrativa de policía (sanitaria), que se expresa tradicionalmente en limitaciones, órdenes, prohibiciones o reservas, predeterminadas en la ley, y otra, muy distinta, el ejercicio de poderes de emergencia extraordinarios[35].

Como también es diferente lo que históricamente haya podido disponer la legislación contra las epidemias y lo que hoy puede prever esa legislación en el marco de un Estado constitucional de derecho[36]. El argumento histórico, obvio es decirlo, no legitima aquellas acciones –u omisiones– del legislador o del Ejecutivo de hoy que no cumplan con los presupuestos constitucionales[37]. De hecho, el art. 3 Ley 3/1986 evoca otros tiempos[38], en los que acaso sus textos predecesores pudieron dar cobertura a actuaciones que hoy resultarían inadmisibles[39].

Sean viejas o nuevas las medidas que quepa adoptar[40], su régimen jurídico habrá de acomodarse igualmente a la Constitución y, en lo que ahora importa, al principio de legalidad y a la reserva de ley[41].

1.4.5. La distinción entre las declaraciones formales de emergencia (extraordinaria) y su efectivo ejercicio fuera de tales declaraciones

Más allá de la pugna por las sucesivas «coberturas formales» para restringir derechos fundamentales (alarmas, entre-alarmas, posalarma, legislación sanitaria, excepción), lo cierto es que, en mayor o menor medida, se han ejercicio sin solución de continuidad poderes extraordinarios, que, como se ha dicho, no se han limitado a las restricciones generales de los derechos fundamentales, sino que además han podido alcanzar a otros pilares del Estado, como el sistema de fuentes. Así ha ocurrido también cuando cesaban los estados de alarma con tantos reglamentos sanitarios, aprobados, además, sin habilitación formal ni regulación legal suficientes[42].

1.4.6. Un resumen sobre la distinción entre el derecho ordinario y el extraordinario

En términos muy simples y a nuestro limitado propósito, en el derecho ordinario, los actos jurídicos del Ejecutivo –reglamento y acto administrativo– son «aplicativos», es decir, siguen *la cascada reguladora habitual*: una ley que delimita y prevé con la exigible precisión (del «presupuesto de hecho» y «consecuencia jurídica», entre otras formas posibles de programación legislativa), un reglamento que ejecuta o implementa en su caso la ley, y un acto de aplicación. Por definición, el reglamento no puede crear lo que la ley no ha autorizado en materias reservadas a la ley, sino solo ejecutar –concretar– la ley previa, menos aún contradecir y desplazar a las leyes[43]. En

35. I.4.

36. Ciertamente, el derecho administrativo, como «ciencia de frontera» va por delante en muchos terrenos. No resulta extraño que los primeros tratados de derecho administrativo escritos en español se ocuparan de la lucha contra las epidemias. Por ejemplo, Manuel Colmeiro, *Derecho Administrativo español*, Madrid, 1850 (*cf*. Biblioteca Digital Hispánica). Este autor sigue y cita a P. Gómez de la Serna, *Instituciones de Derecho Administrativo*, 1843.

37. Si en el pasado un artículo como el 3 de la Ley 3/1986 pudo dar cobertura a injerencias singulares sobre derechos fundamentales, y aun a restricciones más amplias, hoy no resistiría el más mínimo análisis en el constitucionalismo occidental (III, IV).
Al fin y al cabo, la Constitución genera un efecto civilizador sobre el derecho administrativo, que, insertado en un específico hábitat constitucional, deja entonces de ser una mera tecnología jurídica al servicio del poder, para convertirse en «porteador» de los valores, bienes y derechos constitucionales hasta el último rincón de la acción administrativa.

38. Por ejemplo, la base 19.ª de la Ley de 25 de noviembre de 1944, de bases de la sanidad nacional, dispone que los Gobernadores Civiles «adoptarán en casos urgentes y bajo su responsabilidad las medidas necesarias que estimen convenientes para preservar la salud pública de epidemias, enfermedades contagiosas, focos de infección y otros riesgos análogos». Si nos retrotraemos aún más cabe advertir otros antecedentes. Así, por ejemplo, el art. 133 del proyecto de ley de Sanidad Civil de 1885 establecía que «el Gobierno, asesorado del Consejo, queda revestido de amplias facultades para disponer cuanto crea conveniente en los casos de epidemia» (*Gaceta de Madrid*, núm. 81, de 22 de marzo). La Ley de Sanidad de 28 de noviembre de 1855 contiene disposiciones de ese estilo (art. 58, 59). Etc.

39. Nota anterior e *infra* IV.3.

40. Recuérdese que legislación administrativa contra las epidemias, en nuestro país y en los de nuestro entorno, se ha traducido históricamente en el confinamiento de las personas infectadas o sospechosas de contagio, no en el confinamiento preventivo de un país, como se ha producido con el COVID-19. Es algo nuevo confinar a personas sanas y a escala nacional. Acaso ese haya sido el reto principal al que se han enfrentado tantos Estados, aun cuando el derecho a la libre circulación se haya visto limitado de un modo menos severo que en nuestro caso (art. 7.1 RD 463/2020, de 14 de marzo; *infra* III).

41. Sea como fuere, a la Constitución le resulta indiferente la denominación doctrinal (por ejemplo, de «policía administrativa», predicada de unas potestades y un ámbito del ordenamiento). De ello no depende la proyección de sus exigencias. De hecho, alguna doctrina alemana inscribe a su Ley contra las enfermedades infecciosas en el campo de la seguridad o dentro de la «policía administrativa», pero reconociendo que sus poderes ordinarios y extraordinarios están sometidos a los máximos rigores del ordenamiento (*infra* III).

42. *Infra* IV. Pareciera como si el hecho de cesar el estado de alarma hubiera traído consigo *de facto* el cese del Derecho extraordinario, como si desde ese momento ya no se hubieren ejercido poderes de emergencia, y todo ello pese a lo que evidenciaban los diarios oficiales. A la alarma, pues, no le ha seguido la normalidad, sino la excepcionalidad durante largos meses. No ha habido antinomia, ni dualismo «alarma-normalidad», aun cuando no siempre se hayan limitado, ni en la misma medida, todos los derechos.

43. Ciertamente, la distinción no es geométrica ni perfecta, puesto que la previsión normativa no puede ser exhaustiva. De ahí que tenga sentido la autorización o ratificación clásicas de las medidas singulares.

el derecho extraordinario, por el contrario, el reglamento –el gran protagonista– puede ser «creativo» e innovador, hasta el punto de oponerse a las leyes en los supuestos excepcionales y provisionales establecidos[44].

2. LA ABDICACIÓN DE LA «FUNCIÓN LEGISLATIVA DEL ESTADO» (ART. 66.2 CE)

Cabe sostener, a resultas de cuanto ha quedado dicho, que a las Cortes Generales les corresponde establecer el marco legislativo adecuado para habilitar, condicionar y controlar el ejercicio de los poderes de emergencia atribuibles al Ejecutivo, bien sean estos de carácter ordinario, o bien de naturaleza extraordinaria[45].

Sabido es, sin embargo, que las Cortes, durante la pandemia, se han resistido a toda acción legislativa en este terreno, sea para aprobar una ley contra las enfermedades contagiosas o infecciosas en general o contra el COVID-19 en particular, o sea para reformar o completar la LOAES. La inactividad legislativa de las Cortes se encuentra en la base de la mayor parte de las controversias jurídicas suscitadas[46] y de los problemas de constitucionalidad a que incidentalmente se alude de seguido[47].

La abdicación constitucional de la «potestad legislativa del Estado» (art. 66.2 CE) en este punto causa la desprotección de los derechos, quiebra principios básicos como el Estado democrático de derecho y genera innecesariamente otros graves problemas constitucionales, al forzar, entre otras cosas, el uso de una infraestructura legal –la legislación sanitaria ordinaria[48]– manifiestamente incapaz de soportar el peso. Entre esas derivadas, destaca la externalización del coste político que han de asumir las Cortes y el Gobierno en la lucha contra la pandemia hacia los jueces. Veámoslo más despacio.

2.1. Las diversas opciones del legislador estatal

Sin perjuicio de cuanto luego se dirá[49] es posible advertir a la vista del epígrafe anterior que la legislación sanitaria vigente no da cobertura suficiente, salvo para pocas cosas de *ordinaria administración* en la lucha contra el COVID-19, y que, en consecuencia, no satisface los requerimientos más elementales del principio de legalidad y de la reserva de ley[50], por distintos conceptos[51].

Queda fuera de nuestro objeto el estudio –en positivo y detallado– de las alternativas y combinaciones legislativas posibles. Pero las hay[52]. Lo que importa ahora es notar, primero, que la legislación sanitaria vigente no es una ley de lucha contra las enfermedades infecciosas[53]; y, segundo, que sumados los pocos preceptos aislados de las leyes de cabecera[54] ni siquiera constituyen un entramado legal que dé soporte completo al ejercicio de las potestades ordinarias del Ejecutivo y de las Administraciones[55], menos aún para otorgarles «plenos poderes»[56]. Las Cortes Generales podían, y *debían*, legislar[57]. Sin entrar a valorar ahora las diversas fórmulas de cumplimiento del deber de legislar[58], lo cierto es que la aprobación de una

44. A título de ejemplo, *infra* III. De cuanto antecede, se aprecia fácilmente que tantos reglamentos dictados al amparo del art. 3 Ley 3/1986 por las Comunidades Autónomas no cumplen con las indicadas exigencias del derecho ordinario. Y operan como si se incardinaran en la órbita del derecho extraordinario, aunque sin la habilitación del art. 116 CE.

45. Núm. I. Las potestades ordinarias en este caso se ubican en la legislación sanitaria ordinaria; las potestades extraordinarias en la LOAES y, en su caso, con remisión a la legislación sanitaria. Una y otra, como se reitera en el texto, podrían confluir en una ley de pandemias (o ley contra enfermedades infecciosas o contagiosas).

46. Desde qué hacer con las elecciones pendientes, hasta cómo se elige a los científicos y expertos que asesoran, así como su función en el proceso decisorio; desde la clarificación del sistema de fuentes hasta las funciones, efectos, alcance temporal o procedimiento de los reglamentos de emergencia sanitaria, hasta las prórrogas de la declaración de alarma; desde la fijación por ley de los criterios epidemiológicos justificadores de la escala de restricciones, hasta los límites de la delegación del Gobierno a las Comunidades Autónomas. Por contraste, véanse los países referenciados en el núm. III.

47. II.2, IV y V.

48. *Infra* IV.

49. *Infra* IV.

50. Notas 16-17, 10-11.

51. I, IV.1.

52. Véase *supra* núm. I. Asimismo en la nota 57 se esbozan algunos ejemplos, las opciones más «conservadoras», en derredor del art. 116 CE. Pero hay más alternativas, a nuestro juicio, que no cabe examinar aquí.

53. IV.1.

54. Nota 10.

55. I, III, IV.

56. I, IV.

57. Y ello en primer término y sobre todo fuera de la cobertura del estado de alarma (I.1.2, IV.1): regulación de las potestades, procedimientos, organizaciones y medidas *ordinarias* contra la enfermedad infecciosa. Esto es, una ley general contra las enfermedades.
En paralelo, aunque en un plano distinto, cabría haber actualizado la Ley Orgánica 4/1981, de 1 de junio, de los estados de alarma, excepción y sitio (LOAES) dentro del esquema del art. 116 CE. Los ejemplos sobre eventuales mejoras de la LOAES a la vista de la experiencia podrían multiplicarse en los tres planos indicados: a) sistema de fuentes (qué, cómo y quién aprueba los reglamentos de emergencia sanitaria, su vigencia temporal y control; exclusión del decreto-ley de la cadena normativa porque constituye un instrumento especial pero del derecho ordinario y cuyas normas además permanecen; etc.); b) derechos fundamentales: cuándo, y en qué condiciones, caben qué tipo de restricciones en el ámbito sanitario sobre qué derechos fundamentales (véase el modelo comparado: III); y c) alteraciones competenciales temporales (ahora previstas de un modo muy insuficiente). Desde luego también habría cabido, sin reforma de la LOAES, aprobar una ley específica contra el COVID-19 (vinculada al art. 116 CE para el ejercicio de potestades extraordinarias), comprensiva de las cuestiones principales, y modificadora en su caso de preceptos concretos de otras muchas leyes mientras dure la pandemia, como han hecho Reino Unido, Francia o Alemania: desde la celebración de las elecciones y las cuestiones competenciales, pasando por la participación y organización de los expertos, hasta las ayudas económicas y sociales. *Infra* III. Respecto de Francia, véase por todos Estelle Chambas, Thomas Perroud, «France: Legal Response to COVID-19», en *OxConLaw,* julio 2021).

58. Véase II.4 y IV. Así, por ejemplo, queda fuera de nuestro examen el carácter de una ley general contra el COVID-19 (nota anterior), y que por

ley contra las infecciones o enfermedades contagiosas resulta constitucionalmente exigible[59], tanto para el ejercicio de potestades ordinarias, como para el de potestades extraordinarias (donde la legalidad formal reforzada ha de combinarse con la intervención del parlamento mediante la declaración que corresponda).

2.2. El problema constitucional de fondo

Conviene deslindar el tema constitucional de *origen*, que no es otro que la medida *inactividad* de las Cortes Generales[60] para regular el ejercicio de poderes ordinarios y, más aún, extraordinarios (y tantas cuestiones conexas), de los problemas *derivados* por consecuencia o conexión. La omisión adquiere una mayor trascendencia constitucional, desde luego, cuando la excepcionalidad se mantiene fuera del estado de emergencia del art. 116 CE. Porque, en tal caso, de esa omisión se desprenden además otros problemas constitucionales, al compeler a las Comunidades Autónomas y a los jueces a llevar a cabo actividades contrarias a la Constitución, esto es, a hacer uso de potestades ordinarias y extraordinarias sin habilitación formal ni directriz legislativa[61] y a desplegar funciones cuasi-normativas, respectivamente[62].

2.2.1. La resistencia de las Cortes a aprobar un derecho extraordinario de emergencia sanitaria

La posición oficial en este caso, siquiera sea implícitamente, podría resumirse así: la alarma mantenida a lo largo del tiempo (sin necesidad de ir acompañada de una ley contra las enfermedades infecciosas permitiendo así que sean las Cortes las que establezcan las reglas fundamentales) y, en su defecto, la legislación sanitaria existente, ofrecerían cobertura suficiente para adoptar todas las medidas necesarias.

Dejando al margen ahora los argumentos jurídicos que de contrario quepa esgrimir[63], lo cierto es que Gobierno y Cortes Generales no parecen convencidos de esa tesis cuando a la omisión del *deber de legislar* se le une una actitud positiva y beligerante para desembarazarse de él[64], obligando, primero, a las Comunidades Autónomas a aplicar un estado de alarma progresivamente rebajado, primero[65] y, después, una legislación sanitaria que no puede otorgar poderes excepcionales, ni cubre siquiera el conjunto de potestades ordinarias que podrían desplegarse, y, segundo, a los jueces a compartir funciones cuasi-normativas[66]. Si el marco legislativo fuera realmente bastante, no hubieran sido necesarias esas artificiosas operaciones de «alejamiento» de la respuesta legal al COVID-19 desde el centro –las Cortes Generales– hacia la «periferia»; desde el poder legislativo hacia el

---

hipótesis podría contener preceptos de naturaleza orgánica, básica y ordinaria, según los casos y temas que aborde. Desde luego, todo lo que guarde relación con los poderes de emergencia extraordinaria –que es la clave de todo análisis– ha de tener naturaleza orgánica, puesto que no es sino un desarrollo o especificación del art. 116 CE.

Pero es que además si se trata de medidas sanitarias en el ámbito del derecho ordinario (fuera ya del estado de alarma), habría de concluir en igual sentido: no les sería tampoco de aplicación, a nuestro juicio, la doctrina de la reserva de ley orgánica relativa a los «límites» de los derechos, lo que, traducido al lenguaje jurídico-administrativo, equivale a hablar de «régimen legal» del sector de que se trate. Con las restricciones –generales y singulares– para luchar contra enfermedades contagiosas no se define desde luego el régimen ordinario del derecho en cuestión; se hace algo muy distinto, se actúa de modo excepcional, con los riesgos que ello comporta. Dicho de otro modo: si el desarrollo, el normal ejercicio, está reservado a la ley orgánica, con mayor razón, aquellas medidas ordinarias o extraordinarias que rompen o quiebran ese desarrollo o normal ejercicio, su contenido normal. No estamos aquí hablando de simples límites.

59. *Supra* I y IV.1.

60. I, II.1, III y IV. Por lo demás, a estos efectos, no se consideran las conversiones en ley de los decretos-leyes, puesto que con ellas no se ha realizado una regulación tal.

61. Para ilustrarlo, *infra* III y IV.1. Aludimos a las potestades ordinarias y extraordinarias ejemplificadas en el núm. I.4.

62. II.1.2.c), IV.2. No cabe detenerse aquí. Baste notar que la inconstitucionalidad de esta función cuasi-normativa –la ratificación de un proyecto normativo– no deriva del hecho de que se establezca un control judicial previo (lo cual sería admisible), sino de su objeto y funcionalidad. En pocas palabras, la intervención judicial –en la reforma legal inducida, a la que luego se alude– se asemeja y equivale a un segundo momento del procedimiento normativo, no a un control propiamente judicial.

En efecto, se trata de algo más que de un «control» previo y abstracto de normas basado en sustancia en la proporcionalidad *en la ley*, lo que resulta ya de por sí poco aprehensible en sede judicial (*infra* IV.2), siendo así que su apreciación técnica y fáctica corresponde en primer lugar al legislador-. Es sobre todo que la ratificación se concibe legalmente –en abstracto– como una verdadera «coproducción», más que como un «control» de la aplicación de la ley y el derecho, no ya solo porque no exista una ley previa cuya implementación pueda enjuiciarse, sino también, y sobre todo, porque el proyecto normativo adquiere validez y eficacia en realidad cuando recibe la aprobación judicial; dicho de otro modo, se le pide al órgano jurisdiccional sin la existencia de una impugnación que opine sobre una medida normativa general y política, que no es de desarrollo o meramente aplicativa, como pudiera ser la exigencia o no del certificado de vacunación en una determinada fecha y área y para determinados establecimientos. Y en tanto su opinión no sea positiva o favorable el proyecto normativo no entra en vigor (así lo ha interpretado el Tribunal Supremo: *infra* núm. IV.3).

No es, pues, que el test o juicio que se ejerce mediante la «ratificación» en sede jurisdiccional sea potencialmente invasivo, que lo es (aunque los jueces podrían autolimitarse y ejercer prudencialmente esa atribución). Es que esa ratificación –bien entendida, vacía de contenido– no puede compensar ni suplir la ausencia de habilitación y de regulación legal (nota 222). Parece una verdadera maniobra de distracción para generar la ilusión de un control judicial.

Para mejor valorar lo que supone a efectos constitucionales la creación de una «ratificación» judicial de una medida de alcance *general* es necesario ponerla en un *contexto* más amplio: la abdicación de las Cortes de su función constitucional y su pretendida transferencia sin soporte jurídico a jueces y Comunidades Autónomas; la anomalía de revestir de carácter casacional un juicio que se basa en realidad en el examen de los hechos (*infra* núm. IV.3); o la dificultad de realizar un juicio de proporcionalidad *en la ley* (*ibid.*). En cuanto al contexto, véanse también las notas 73 y 76, de suyo elocuentes.

63. I, III-IV.

64. II.1.2, V.

65. Véase el siguiente epígrafe.

66. *Ibid.*

Ejecutivo autonómico y hacia el poder judicial. Los parlamentos centrales de Reino Unido y Alemania, por ejemplo, han asumido su responsabilidad, sin perjuicio de conferir o regular las competencias que a los demás niveles de gobierno correspondan (III).

2.2.2. *La externalización del coste político de la lucha contra la pandemia hacia las Comunidades Autónomas y los jueces*

A tal efecto se han sucedido tres operaciones jurídicamente objetables[67]:

a) De un lado, desde las instancias centrales se ha producido una progresiva *degradación* en el uso del instrumento de derecho extraordinario disponible (art. 116.2 CE y LOAES)[68]. El último estado de alarma general (2020/21)[69] ha terminado por incurrir en la deslegalización de los criterios justificativos[70], en la delegación generalizada[71] y en la desaparición del Congreso en su control quincenal[72].
b) De otro, se ha insistido en la *pretendida suficiencia* de una legislación sanitaria –pese a la notoria vaciedad del art. 3 Ley 3/1986 y la continuada excepcionalidad *de iure* y *de facto* en los meses posteriores a las declaraciones de alarma de 2020 y 2020/21– para dar soporte a la acción de las Comunidades Autónomas, sin reforma legal alguna[73].
c) Para cerrar el círculo –y lograr una cierta *tolerancia social* hacia las restricciones autonómicas, ya no estatales–, se les confiere a los jueces funciones que no les competen, al transformar las técnicas de la autorización y de la ratificación, que operan por definición en relación con las medidas administrativas *singulares*[74], en un control *abstracto* y previo (y, por lo demás, etéreo) de normas[75]. Ante la resistencia de los juzgados a aceptar medidas restrictivas generales sin la cobertura del art. 116 CE y/o ante la natural diversidad de sus resoluciones, consecuencia a su vez de la variedad de circunstancias sometidas a su conocimiento, el legislador responderá encomendando esa función a los TSJ, afirmando por la puerta de atrás –a través de una reforma procesal y sin previa ley sustantiva– que las Comunidades Autónomas estarían habilitadas para establecer restricciones generales de los derechos fundamentales[76]. Y ante la inevitable diversidad de respuestas de los TSJ y/o la oposición de estos a participar en una función cuasi-normativa[77], el Gobierno responderá mediante decreto-ley creando un nuevo recurso de «casación» ante el TS[78].

El legislador, pues, ha presionado al poder judicial haciéndolo *corresponsable* –ante la sociedad– con las Comunidades Autónomas, de la respuesta jurídica al COVID-19. Como si el problema fuera de los jueces y tribunales, y no del legislador estatal en primer término.

2.3. Problemas constitucionales derivados en períodos de «entre alarmas» y de «posalarma»

De un lado, el ejercicio de poderes extraordinarios –y aun de ordinarios– sin base jurídica (esto es, sin la necesaria *habilitación* y *regulación* legislativas) supone una «materialización difusa y sistémica» de vulneraciones constitucionales a manos de Comunidades y Ciudades Autónomas (de la reserva de ley, del principio de legalidad, del sistema de fuentes del derecho, de la vinculación a los derechos fundamentales... y de la democracia parlamentaria). De otro, la aceptación en sede jurisdiccional

67. Nota 1, núm. 1 y IV.1.
68. A ello puede no ser ajeno el hecho de la inexistencia de una ley general contra las enfermedades infecciosas (I, III, IV.1). Y es que la alarma parece idónea para afrontar situaciones imprevistas y acotadas en el tiempo y en el espacio, esto es, para enfrentar la incertidumbre y gobernar lo imprevisible, pero no para mantener a lo largo del tiempo y del espacio una simple cobertura formal para la acción gubernamental, sin ir acompañada de normas sustantivas, procedimentales y organizativas, de todo un programa legislativo. El hecho es que, en marzo de 2020, numerosos países de referencia (EE. UU., Alemania, Reino Unido, Francia...) aprobaron en sus parlamentos las leyes necesarias, porque se sabía qué medidas típicas convenía adoptar, por más que se le reconozca al Ejecutivo un amplio margen de maniobra.
69. Así, el declarado por el Real Decreto 926/2020, de 25 de octubre.
70. *Ibid*. art. 9.1.
71. *Ibid*. art. 2.
72. *Ibid*. art. 14; Resolución de 29 de octubre de 2020, del Congreso de los Diputados. Del ordenamiento se deriva, sin embargo, una conclusión contraria (art. 116 CE, 162 del Reglamento del Congreso de los Diputados), si se tiene en cuenta además el concepto jurídico de prórroga (por definición nunca superior al plazo principal) y el principio democrático que obliga a compensar *ex post* el déficit democrático que suponen los poderes extraordinarios atribuidos al Gobierno.
73. Hasta el punto de que el Gobierno ha recurrido cualquier intento del legislador autonómico para dotar de cobertura y regulación legal a sus respectivas autoridades sanitarias. Así, el recurso de inconstitucionalidad del Gobierno contra la Ley de la Comunidad Autónoma de Galicia 8/2021, de Salud (BOE, 102, de 29 de abril de 2021).
74. Igualmente, apreciables en el derecho comparado. Véase III.1.
75. IV.2.
76. Art. 10.8 de la Ley 29/1998, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-administrativa, introducida por la disposición final 2.2 de la Ley 3/2020, que pretende transformar el control judicial en co-gobernanza al prever que los jueces autoricen o ratifiquen las medidas generales restrictivas de derechos fundamentales, presumiendo además que el minúsculo art. 3 de la Ley Orgánica 3/1986 le estaría otorgando esos poderes a los Ejecutivos autonómicos, poderes que incluirían –aunque no se advierta– la potestad de desplazar a las leyes mediante los reglamentos sanitarios.
Por lo demás, e irónicamente, las Cortes Generales no dudan, esta vez sí, en acudir a ley parlamentaria para externalizar la responsabilidad política hacia Comunidades Autónomas y jueces.
77. Cuestión de inconstitucionalidad 6283 2020 planteada por el TSJ Aragón en relación con el art. 10.8 LJCA.
78. Art. 15.3 del Real Decreto-ley 8/2021, de 4 de mayo. *Infra* IV.2.

de normas administrativas sin base jurídica suficiente o un sistema de fuentes desarbolado (en lugar de rechazar –entre otras cosas– que un reglamento pueda desplazar a las leyes[79]), y la colaboración en el mecanismo de la «ratificación» de normas, en vez de oponerse mediante cuestión de inconstitucionalidad, suponen asumir el desbordamiento del principio democrático y de la división de poderes.

2.4. ¿Remedios jurídicos directos frente a la inactividad parlamentaria? La experiencia comparada

Pocos remedios jurídicos cabe esperar que ponga a disposición un parlamento que se niega a ejercer su función constitucional más genuina –de legislar y de controlar al Gobierno– en contra de las esencias de la democracia representativa.

No obstante, la comunidad jurídica ha de explorar todas las opciones posibles para proponer soluciones. Una de ellas la proporciona el modelo alemán, que admite el recurso de amparo ante la inactividad del legislador parlamentario, en la medida en que ello pueda implicar la desprotección de los derechos fundamentales.

Se trata de un *recurso de amparo por omisión* que se dirige directamente contra el parlamento[80]. El demandante deberá invocar un mandato de la Constitución del que se derive con claridad el deber de legislar[81]. En el caso de la protección contra la infección, el recurso se habría de fundar en primer término en el deber de proteger la vida y la salud que pesa sobre el legislador[82], aun cuando puedan invocarse otros derechos fundamentales, si concurre una incompleta inactividad legislativa en relación con las enfermedades infecciosas en general y con el coronavirus en particular.

Procesalmente, allí se distingue entre el amparo deducido frente a una completa inactividad (cuyo enjuiciamiento resulta más simple), de aquellos otros supuestos en los que la legislación –existente– deviene insuficiente, en cuyo caso la impugnación se basará, no en la pura omisión, sino en la insuficiencia de la protección del derecho fundamental de que se trate[83]. Con todo, en este último caso, como cabe entender, el control de suficiencia por parte del Tribunal Constitucional resulta limitado[84]. Con carácter general, para que se entienda satisfecho el deber de legislar, el Tribunal Constitucional exige que el parlamento intervenga mediante un proceso legislativo formal, sin que baste una mera participación parlamentaria[85].

3. UNA MIRADA COMPARADA SOBRE EL PRINCIPIO DE LEGALIDAD EN LA LUCHA CONTRA EL COVID-19

Conviene hacer tres observaciones preliminares para poner en contexto las páginas que siguen:

1. Puede afirmarse que ningún ordenamiento jurídico estaba completamente preparado a marzo de 2020 para hacer frente a esta pandemia, como atestigua la incesante actividad legislativa acaecida desde su inicio hasta nuestros días en tantos países[86].
2. Sin embargo, ciertos sistemas nacionales de referencia partían de una posición de ventaja puesto que disponían de leyes contemporáneas, actualizadas y ambiciosas en la materia, esto es, de leyes generales que contemplaban con extensión e intensidad la lucha contra la enfermedad infecciosa. Tal es el caso de Gran Bretaña, Alemania o Francia, entro otros. Así y todo, consideraron que ello no era suficiente. Y por ello aprobaron por vía de urgencia en el mismo mes de marzo de 2020, leyes específicas contra el

79. Y ello con independencia de que las leyes pretendidamente inaplicables a manos de un reglamento se refieran al ejercicio de derechos fundamentales o de cualquier otra libertad de configuración legal.

80. Sentencia de 30 de junio de 2015 (BVerfGE 139, 321, 346, párr. 82); Sentencia de 24 de marzo de 2021 (1 BvR 2656/18 –, Rn. 1-270, párr. 95). Quiero expresar mi agradecimiento al Profesor Martin Eifert, de la Universidad Humboldt de Berlín, por la información y orientación facilitada en esta materia.

81. *Ibid.* primera sentencia citada.

82. Nuestro art. 15 CE, a diferencia del art. 2.II GG, no invoca expresamente a la ley. No obstante, la vinculación del parlamento a los derechos fundamentales (art. 9.1, 53.1 CE), y las expresivas llamadas a la ley no ya solo del 53.1 CE, sino del entero Título I, y de otros muchos preceptos (art. 103.1), permiten construir, según los casos y los derechos implicados, un deber positivo de legislar.

Téngase en cuenta que la STC 181/2000, f.j. 8 puede constituir un primer paso en esa dirección. Agradezco a la profesora Margarita Beladiez Rojo la observación respecto de la referida Sentencia constitucional, así como las observaciones formuladas sobre otros aspectos constitucionales relacionados con este trabajo, que sin duda han contribuido a enriquecerlo.

83. Sentencia de 24 de marzo de 2021, cit. párr. 95.

84. *Ibid.* párr. 152. La explicación es evidente: «Los derechos subjetivos de defensa contra la injerencia del Estado que se derivan de los derechos fundamentales, por un lado, y los deberes de protección que se derivan del significado objetivo de los derechos fundamentales, por otro, difieren fundamentalmente entre sí en que el derecho de defensa prohíbe una conducta estatal concreta en su objetivo y contenido, mientras que el deber de protección es fundamentalmente indeterminado».

La jurisprudencia concluye, pues, en la violación del deber de legislar cuando no se aprueba ley alguna, cuando ésta resulta manifiestamente insuficiente o inadecuada para satisfacer el fin perseguido, o se queda muy por debajo del nivel de protección (*ibid.*).

85. *Ibid.* (véase el resumen de la sentencia, núm. 5). Lo que, aplicado a nuestro caso, debiera excluir la convalidación del decreto-ley, de lectura única y votación a la totalidad en una sola cámara, con frecuentes contenidos heterogéneos y en todo caso ajenos en rigor a los derechos fundamentales; así como la resolución por la que se prorroga el estado de alarma.

86. Por todos, véase el análisis comparado en el Oxford Compendium of National Legal Responses to COVID-19, *OxConLaw (Legal response to COVID-19):* https://oxcon.ouplaw.com/ home/OCC19

COVID-19, que completaban o reformaban esas leyes contra las enfermedades infecciosas e incidían con carácter transversal sobre otras muchas. Tal es el primer contraste de envergadura con el caso español[87].

El entendimiento que se ha hecho en estos ordenamientos del principio de legalidad es que la ley no solo debe autorizar la acción del Ejecutivo, sino que ha de ocuparse de todas las cuestiones fundamentales relacionadas que surgen desde el comienzo de la pandemia hasta el final de su existencia: desde las medidas restrictivas de derechos y libertades que cabe adoptar, a los criterios epidemiológicos que las justifican en cada caso; desde el modo de selección y participación de los expertos y la función que les corresponde, a la eventual modificación del sistema de fuentes (en particular en lo que hace a la elaboración, efectos, vigencia y control de los reglamentos de emergencia sanitaria); desde qué hacer con las elecciones o referendos pendientes, hasta las medidas sociales y económicas para paliar los efectos de la pandemia; desde las especialidades de la protección de datos, hasta las alteraciones competenciales. El poder legislativo ha establecido el marco sustantivo, organizativo, procedimental en la lucha contra la pandemia.

A esa regulación legislativa –previa y actualizada– se han añadido en estos países las sucesivas declaraciones parlamentarias del estado de emergencia sanitaria, como fórmula de activación y de control de las potestades extraordinarias atribuidas al Ejecutivo. Tales declaraciones no son nominales o vacías de contenido, sino que, al contrario, disponen el lapso temporal en que cabe desplegar tales potestades, la vigencia de las normas emanadas durante el período, su eventual validación, derogación o control, según los supuestos. En estos casos, el doble protagonismo del parlamento –en su función de legislar y de controlar al Ejecutivo– es evidente: de un lado, por ley se establece el marco jurídico; de otro, mediante la declaración parlamentaria correspondiente se controlan las medidas que dentro de ese marco adopte el Ejecutivo.

Por último, ha de notarse que la pandemia del COVID-19 ha planteado un problema jurídico inédito: el confinamiento masivo de la población sana. Esta es una singularidad que no se había dado en el pasado. Tradicionalmente, las medidas se centraban en las personas contagiadas o sospechosas de estarlo, en el cierre de ciertas instalaciones, en el medio ambiente inmediato. Pero no en el confinamiento preventivo de todo un país (con los efectos que ello genera sobre otros bienes, valores y derechos)[88]. Tal es la principal cuestión jurídica que late en los debates habidos en nuestro entorno.

Veámoslo más despacio.

3.1. Reino Unido

3.1.1. Introducción. La infraestructura legal previa a la pandemia del COVID-19: Ley de Salud Pública para el Control de Enfermedades (1984) y la Ley de Emergencias Civiles (2004)[89]

Antes del COVID-19, el Reino Unido disponía de dos leyes para luchar contra las enfermedades contagiosas, en la que se regulaban en detalle los poderes ordinarios y extraordinarios que podía ejercer el Ejecutivo en cada caso.

a) La primera es la Ley de Salud Pública (de Control de Enfermedades) de 1984[90]. En su versión original aludía a infecciones tales como el cólera, la viruela o el tifus, entre otras[91], alineándose en esencia con lo que hemos denominado aquí «emergencia ordinaria»[92]. Con

87. Como se ha notado, España no contaba, ni cuenta, con una ley de enfermedades infecciosas cuando se declara la pandemia, ni tampoco ha aprobado ley alguna durante ese período.

88. Señaladamente, si, como sucedió en la primera declaración de alarma en nuestro país, por medio del art. 7.1 RD 463/2020, de 14 de marzo, el confinamiento adquirió una severidad tal que tan solo se excepcionaba por razones de supervivencia –medicina y alimentación–. Ni siquiera la actividad judicial se consideró esencial, ni se dispusieron legal y materialmente los medios para que los jueces y tribunales pudiera desarrollar con la mayor normalidad posible su actividad, por lo que el derecho a la tutela judicial tampoco pudo ejercerse.

89. La elaboración de esta síntesis se basa en el estudio de la legislación, con el apoyo de la bibliografía que se cita seguidamente, y en primer lugar el estudio de Jeff King y Natalie Byrom, «United Kingdom: Legal Response to COVID-19», en *OxConLaw*, 2021. Quiero expresar mi agradecimiento al profesor Jeff King por su paciente, generosa y concienzuda dedicación para resolver las dudas que el análisis del sistema británico me ha planteado a fin de obtener un retrato fiable a los efectos del presente artículo.

90. *Public Health (Control of Diseases) Act 1984*. Es una legislación originariamente aprobada para Inglaterra y Gales. La versión original, que puede verse en https://www.legis-lation.gov.uk/ukpga/1984/22/contents/enacted (visitada en julio 2021), tuvo un planteamiento mucho más modesto. Fue reformada profundamente en 2008 por la *Health and Social Care Act 2008*, que le confirió la sistemática actual, aun cuando ha experimentado otras reformas más puntuales hasta la actualidad. De acuerdo con su Texto introductorio la Ley tiene por objeto consolidar ciertas leyes relacionadas con el control de enfermedades y con el establecimiento y las funciones de las autoridades sanitarias portuarias, incluidas las leyes relativas al entierro y la cremación y con la regulación de los alojamientos comunes y los barcos de canal.

91. Art. 10 (versión original). *Supra* I.

92. De un lado, muchas de las medidas restrictivas tenían carácter singular o individual. De otro, el art. 13, que autorizaba a dictar reglamentos ejecutivos para el control de enfermedades, preveía restricciones hasta cierto punto de escasa relevancia sobre derechos fundamentales, con vistas al tratamiento de las personas afectadas por cualquier enfermedad epidémica, endémica o infecciosa y para prevenir la propagación de dichas enfermedades, o para prevenir el peligro para la salud pública de los buques o aeronaves que lleguen a cualquier lugar, y para prevenir la propagación de la infección por medio de cualquier buque o aeronave que salga de cualquier lugar.
Por lo demás, las potestades de reglamentación previstas en la Ley de 1984 no pueden utilizarse, por ejemplo, para obligar a una persona a someterse a un examen médico; a ser trasladada a un hospital o a un establecimiento similar; o a ser internada en él; o, lo que es más importante, a ser mantenida en aislamiento o cuarentena. Estas medidas altamente invasivas deben

el paso del tiempo y la sucesivas reformas[93], sin embargo, se había transformado en una Ley mucho más ambiciosa y completa en la lucha contra las epidemias. Se trata de una Ley que distingue de forma sistemática y ordenada entre las restricciones de carácter *singular* de los derechos y libertades, con un evidente protagonismo *judicial*[94], y las restricciones *generales* a través de reglamentos sanitarios de emergencia, sometidos a su vez a procedimientos específicos de control y aprobación *parlamentarios* e importantes requisitos legales[95]. En un caso y en otro solo se pueden aplicar las medidas restrictivas que expresamente permite la Ley[96].

— Las medidas sanitarias de carácter *singular* o individual[97] se clasifican por su afección a las personas[98], a las cosas[99], o a las instalaciones[100]. La Ley determina el procedimiento para su adopción, la duración de estas, y su control[101].
— Las medidas sanitarias de alcance *general*, adoptadas mediante reglamento[102], pueden igualmente ir referidas a personas, cosas e instalaciones[103] en determinados ámbitos. Así, a los ministros competentes que señala la Ley se les atribuye la potestad de aprobar reglamentos con el fin de evitar la propagación de enfermedades infecciosas y, en particular, se les permite elaborar reglamentos sanitarios sobre viajes «para dar efecto a cualquier acuerdo o convenio internacional» relativo a la propagación de la infección o la contaminación»[104]; así como acordar ciertas restricciones cuyas materias enumera[105]. No se trata de una potestad reglamentaria genérica, sino circunscrita a las materias reguladas[106] y sujeta a específicas limitaciones y prohibiciones[107]. Asimismo, la Ley estipula un conjunto de criterios escalonados para garantizar que la proporcionalidad presida la elaboración de los reglamentos de salud pública[108].

Aunque la Ley de 1984 no impuso una vigencia temporal para los reglamentos aprobados a su amparo –como hacen las Leyes de Emergencias Civiles de 2004 y del Coronavirus de 2020, a las que seguidamente se alude–, en la práctica, sin embargo, los mismos reglamentos así lo han dispuesto con frecuencia[109].

La Ley de 1984 en su configuración actual, se sitúa, pues, en un punto intermedio entre la *emergencia ordinaria* (y ahí se incluyen todas las injerencias individuales acordadas judicialmente) y una (limitada) *emergencia extraordinaria* (ejercida a través de reglamentos sanitarios especiales)[110]. Las restricciones más gravosas que se han aplicado durante la pandemia han sido adoptadas en virtud de esta Ley[111].

adoptarse caso por caso (es decir, persona o grupo) y no a escala comunitaria. Véase Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 97.

93. La Ley fue objeto de una profunda reforma en 2008 (nota 90), con ocasión de la transposición al ordenamiento interno de los reglamentos internacionales de la OMS –tras la pandemia de SARS–. Ha tenido otras reformas más puntuales, también en 2020.

94. La mera lectura de los preceptos reguladores de las medidas (45G-45M) evidencia ya la distancia con nuestra pobre Ley 3/1986, en términos de legalidad, certidumbre, reserva de ley, garantías y controles, y, lo que es más importante, desde la perspectiva de la democracia parlamentaria o representativa.

95. Arts. 45B-45F.

96. Se establece, en suma, un régimen jurídico diferenciado y propio para cada una de estas dos vías. En el primer caso, la autorización de las medidas singulares se confía a los jueces, mientras que en el segundo el control político de los reglamentos sanitarios se le atribuye al parlamento.

97. Son órdenes impuestas por el juez de paz en colaboración con la autoridad sanitaria (art. 45G-45M).

98. Art. 45G. El juez (véase nota anterior) puede acordar el examen médico, el ingreso hospitalario, la obligación de llevar protección, etc.

99. Art. 45H. Si una cosa puede estar infectada o contaminada, el juez (véase nota anterior) puede acordar su aislamiento o cuarentena, por ejemplo.

100. Art. 45I. Análogo al ejemplo de nota anterior, aunque referido a una instalación.

101. Arts. 45G-45O.

102. Ha de recordarse que los reglamentos en el Reino Unido tienen la consideración de «legislación delegada». De ahí el tradicional control parlamentario. Dentro de ese contexto, los reglamentos de emergencia sanitaria están sometidos a controles específicos. Con carácter general, véase Jeff King, «The Province of Delegated Legislation», en *The Foundations and Future of Public Law: Essays in Honour of Paul Craig*, OUP, 2020. Para una perspectiva comparada de la posición del reglamento y su control –en tiempos ordinaries y con carácter general–, véase Susan Rose-Ackerman, *Democracy and Executive Power: Policy– making Accountability in the US, the UK, Germany and France*, Yale University Press, 2021.

103. Art. 45C(3).

104. Art. 45B.

105. Art. 45C. Cierre de las escuelas, prohibición o restricción relativa a la celebración de un evento o reunión, restricción o condiciones relativas a la manipulación, transporte, inhumación o incineración de cadáveres o de restos humanos.

106. *Ibid.*

107. Entre otros, art. 45D (restricciones a la potestad reglamentaria del art. 45C) y 45E (prohibición de imponer mediante reglamento tratamiento médico). Por su parte, el art. 45F añade otras medidas complementarias que pueden regular los reglamentos sanitarios, tales como atribuir funciones a las autoridades locales y a otras personas; prever la ejecución y el cumplimiento de las restricciones y los requisitos impuestos por los reglamentos o en virtud de ellos; prever recursos y revisiones de las decisiones adoptadas en virtud de los reglamentos; permitir o exigir el pago de incentivos, compensaciones y gastos; etc.

108. Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 25: 45D(1); 45D(4)(a); 45R(2); 45F(7)-(8); todo reglamento aprobado al amparo del art. 45C ha de prever un recurso, según el 45F(6); sobre protecciones adicionales ante las restricciones adicionales 45C, 45D, 45F, 45Q; 45E; etc. Los mismos autores afirman, sin embargo, que la urgencia y la proporcionalidad en sí mismas no son materias que resulten fácilmente fiscalizables en sede judicial (núm. 26).

109. Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 26.

110. Así se infiere con naturalidad de la Parte 2a de la Ley y de los preceptos antes citados. Véase asimismo Lord Sumption, «Government by decree», citado en nota 1. Podría decirse que el carácter parcialmente extraordinario deriva del hecho de que estos reglamentos, aunque delimitados de forma positiva y negativa, no son puramente ejecutivos (véase nota 102).

111. Ello ha originado la polémica sobre la falta de cobertura legal que ofrece esta Ley para acordar el confinamiento generalizado de personas

b) La segunda ley anterior al COVID-19 es la Ley de Emergencias Civiles de 2004 (LECi)[112], prevista en realidad para escenarios de emergencia más graves o extraordinarios que los que contempla la Ley de 1984, y entre otros, para hacer frente a acontecimientos o situaciones que amenacen con causar un daño grave al bienestar humano en cualquier lugar porque impliquen, causen o puedan causar pérdida de vidas humanas, enfermedades o la interrupción de los servicios relacionados con la salud[113].

La LECi actualiza los supuestos de emergencia civil grave, incluida la sanitaria[114]. La Ley prescribe que los reglamentos de emergencia sean examinados en el Parlamento en un plazo de siete días a partir de su elaboración (de lo contrario pierden su vigencia) y pueden ser modificados por resolución de ambas cámaras[115]; asimismo dispone en qué forma pueden desplazar a las leyes del Parlamento[116], la obligación de renovar su vigencia a los treinta días[117], la prohibición de utilizarlos en determinadas materias y ámbitos[118], así como su control parlamentario[119].

A esta Ley subyace el entendimiento de que la *legislación secundaria* de emergencia (esto es, los reglamentos aprobados en virtud de la LECi) es *extremadamente peligrosa en términos constitucionales*[120]. De ahí que su ejercicio deba observar una estricta subsidiaridad. En primer lugar, el punto de partida se sitúa en su prohibición: no se podrán aprobar tales reglamentos, salvo que sean necesarios y urgentes; la segunda condición radica en que el derecho ordinario –la legislación existente– resulte insuficiente para resolver el problema; y la tercera, que no haya tiempo de promulgar una ley al respecto, ni siquiera por el procedimiento de urgencia[121]. La LECi se ocupa también de otras materias propias de una situación extraordinaria[122].

Sin embargo, pese a reconocerse por el propio Gobierno que era la ley apropiada para combatir la pandemia[123], y tras un intenso debate que aún perdura[124], no ha sido la elegida, y en su lugar se aprobó una nueva, la Ley del Coronavirus de 2020[125], sobre la base de la Ley de 1984.

---

sanas, puesto que, en efecto, la Ley solo habla de confinar a personas sospechosas de estar contagiadas. A juicio de Lord Sumption ello incurre en *ultra vires*: «Government by decree», nota 1.

112. *Civil Contingencies Act 2004*.

113. Art. 1(1), 1(2). El art. 1(1) añade en esa lista cerrada: un acontecimiento o situación que amenace con causar un daño grave al medio ambiente de un lugar del Reino Unido, o una guerra o terrorismo que amenace con causar un daño grave a la seguridad del Reino Unido.

114. En Reino Unido no existe un procedimiento constitucional formalizado para declarar el estado nacional de emergencia, pero esta Ley hace las veces de una tal declaración y es su equivalente funcional. Véase Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 11. Al invocar las medidas que la ley contempla, el Gobierno está afirmando que «esto es una emergencia». Como los reglamentos están sujetos a control y participación parlamentarios (hay diversos procedimientos de aprobación), la vigencia del estado de alarma y el ejercicio de los poderes de emergencia no quedan en las manos exclusivas del Ejecutivo.

115. Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 11.

116. Arts. 20 y ss., 26, 27 y 28. Véase nota 102.

117. Art. 26: los reglamentos nacen con «fecha de caducidad» de treinta a días a contar desde la fecha en que son aprobados, o pierden su vigencia antes si así lo dispusieran.

118. Tienen un ámbito material delimitado, en más (art. 22.3: pueden regular lo que podría regularse mediante ley en el parlamento en el ejercicio de una prerrogativa real) y, sobre todo, en menos (art. 23.3-5). De entre las materias vedadas a los reglamentos de emergencia cabe destacar las siguientes: no pueden exigir a una persona, o permitir que se le exija, que preste el servicio militar, ni prohibir o permitir la prohibición de participar en una huelga u otra acción industrial, o cualquier actividad relacionada con ella. Las normas de emergencia no pueden entrar en materia penal, ni pueden modificar la parte de la Ley que regula los poderes de emergencia (arts. 19-31), ni la legislación de derechos humanos de 1998.
Aunque estas prohibiciones materiales parecen obvias, no son superfluas si se tiene en cuenta, primero, que el reglamento de emergencia puede desplazar a la ley, lo que obliga a fijar qué leyes nunca pueden ser desplazadas por estos reglamentos; y, segundo, porque el Reino Unido carece de Constitución escrita.

119. Art. 27 y ss.

120. Lord Sumption, «Government by decree», citado en nota 1.

121. Art. 21 (5). De ahí se deriva una conclusión evidente: no toda situación de emergencia legitima sin más la producción de un derecho extraordinario a través de reglamentos, puesto que de entrada cabrá aprobar leyes formales con carácter de urgencia para tiempos de pandemia.

122. Tales como las que se refieren a la organización de los servicios de emergencia y la acción de las autoridades locales, a las responsabilidades de gestión y de información al público, de asesoramiento; a los deberes de cooperación e intercambio de información entre los diversos servicios de emergencia y los servicios públicos y de interés general; y al personal al servicio de la emergencia. Véase Parte I «Disposiciones locales de protección civil». Aspira, en suma, a una planificación y actividad sistémica para enfrentar la emergencia.

123. Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 12.

124. La Comisión Constitucional de la Cámara de los Lores ha seguido abierta durante largo tiempo y muchos de los comparecientes han argumentado que debería haberse utilizado la Ley de Emergencias Civiles de 2004, al menos a corto plazo, debido al superior control parlamentario que ofrece. *Cf*. Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 12.
Para unos debió aplicarse la LECi de 2004 y para otros la de 1984, aunque incorporando los mecanismos de rendición de cuentas que la de 2004 establecía. Véase el Informe «COVID-19 and the use and scrutiny of emergency powers», de la Comisión Constitucional de la Casa de los Lores (*Select Committee on the Constitution: 3rd Report of Session* 2021-22), https://committees.parliament.uk/publications/6212/documents/69015/default/ (julio 2021).

125. La razón aducida por la que se prefirió una nueva Ley de emergencia sanitaria, la del Coronavirus de 2020, en lugar de activar la Ley de 2004, estriba en el riesgo de que no diera tiempo de aprobar una legislación nueva –ni siquiera por el procedimiento de urgencia– al amparo de la Ley Emergencias Civiles de 2004, dados los requisitos tan estrictos que ésta establece.
Quiere decirse que con los criterios sentados por la propia Ley de 2004 no era «necesario» ese régimen, ya que el parlamento podía aprobar por vía de urgencia una legislación (primaria, por tanto) aplicable a la situación, en lugar de aprobar reglamentos de emergencia al amparo de aquella (así se expresa Jeff King respondiendo a mi cuestionario). Lord Sumption, «Government by decree» citado en nota 1, añade que una explicación plausible

3.1.2. *La Ley del Coronavirus de 2020*

La Ley del Coronavirus de 2020 (LC)[126], de notable complejidad y extensión[127], fue aprobada el 25 de marzo de 2020 por vía de urgencia[128] para hacer frente específicamente al COVID-19[129]. Es una Ley de emergencia sanitaria (extraordinaria)[130], de vigencia temporal[131]. Ha formado con la Ley de 1984 el entramado legislativo básico en respuesta a la pandemia.

Añade a la Ley de 1984 una extensa infraestructura legal comprensiva de todas las cuestiones relacionadas específicamente con el COVID-19[132]: desde la movilización del personal sanitario y social, o las medidas de contención del virus, hasta el tratamiento de los fallecidos o el apoyo a las personas[133]; desde las elecciones y referendos pendientes[134], pasando por el uso de la tecnología de vídeo y audio en los procedimientos judiciales[135], hasta las potestades para cerrar escuelas y guarderías[136], el cierre de puertos o la restricción de eventos, reuniones o locales[137]. Ello supuso la reforma puntual y temporal de algunas leyes, aunque se trata de modificaciones que solo afectan a la pandemia del coronavirus y que desaparecerán con la Ley[138].

El control parlamentario de los reglamentos aprobados en virtud de la LC de 2020 resulta más atenuado en ciertos aspectos que en la LECi[139]. En compensación, durante su misma gestación se aprobaron ciertas garantías adicionales: desde la fecha de caducidad de las previsiones legales de la LC (dos años, aunque con excepciones)[140], hasta la renovación parlamentaria de los poderes de emergencia cada seis meses[141].

3.1.3. *Breve recapitulación*

La emergencia sanitaria se ha basado sustancialmente en la Ley de Salud Pública de 1984 y en la del Coronavirus de 2020.

El derecho extraordinario que se activa en sustitución del ordinario se integra o compone, primero, de esas leyes (legislación primaria) y, en segundo lugar y a su amparo, de los reglamentos que dicta el Ejecutivo (legislación secundaria). Estas leyes, como se ha visto, disponen toda la arquitectura de las fuentes del derecho, de las restricciones posibles a los derechos y libertades

para aprobar una ley distinta es también evitar los controles superiores del parlamento sobre los reglamentos de emergencia que derivan de la LECi.

126. *Coronavirus Act 2020*. La Ley fue aprobada en un verdadero maratón, con un debate parlamentario necesariamente breve. Ello fue objeto de no pocas críticas.

No obstante, visto desde el Continente, una aprobación de urgencia de medidas materiales y sustantivas, organizativas y de procedimiento, de fuentes del derecho, de límites y controles, es preferible a un estado de alarma que obliga al Gobierno a «inventar» cada día qué hacer, con un control parlamentario puntual, o a la aprobación del decreto-ley (véase I, II, IV.1, V).

127. Es una «ley pesada», de 102 artículos y 29 anexos, en total más de 200 artículos que suman 342 páginas impresas. Véase Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 17.

128. Aunque su primera lectura fue el 19 de marzo de 2020, tuvo tres días de sesión de escrutinio parlamentario (del 23 al 25 de marzo de 2020), solo uno de ellos en la Cámara de los Comunes. El Gobierno afirmó que celebró múltiples conversaciones entre los diversos partidos en la elaboración del proyecto, cosa que fue reconocido por la denominada Oposición Leal durante los debates parlamentarios. *Cf*. Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 18.

129. Esta Ley complementa la de 1984 pues le atribuye nuevos poderes al Gobierno, al margen de extenderlos también a Escocia.

130. La Ley se preocupa en primer término por ampliar los poderes del Gobierno para reunir y organizar todos los recursos médicos disponibles y para autorizar los gastos públicos necesarios. En sus anexos 21 y 22 se esconden, sin embargo, otros dos poderes adicionales para controlar la libre circulación, en relación con las personas infectadas o sospechosas, y respecto de restricciones en reuniones, eventos, cierre de instalaciones, etc. No autoriza, por el contrario, a confinar a personas sanas, siguiendo con ello una larga tradición, en virtud de la cual se podía confinar a las personas infectadas, pero no a las sanas. El confinamiento de personas sanas solo estaba permitido en la Ley de 2004, que es la única Ley diseñada para emergencias tan graves como para exigir tales medidas. El debate fundamental ha girado en torno a la (falta de) cobertura legal para el confinamiento nacional –por tanto, también de personas no infectadas, ni de personas sospechosas de contagio–. Véase por todos Lord Sumption, «Government by decree», cit. en nota 1. Véase *supra* núm. 1.

Sin embargo, sí amplía los poderes para la cuarentena de los que hayan dado positivo, así como para realizar pruebas a quienes puedan ser sospechosos de padecer la enfermedad. Véase J. Grogan, «Right Restriction or Restricting Rights? The UK Acts to Address COVID-19», *VerfBlog*, 2020/4/17, https://verfassungsblog.de/right-restriction-or-restricting-rights-the-uk-acts-to-address-covid-19/, DOI: 10.17176/20200417-182523-0

131. La Parte II (disposiciones finales) distingue entre los preceptos de carácter temporal –la mayoría– y los que no tienen «fecha de caducidad» de dos años (por ejemplo, en materia de personal).

132. Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 18.

133. *Ibid*.

134. Arts. 59-70.

135. Arts. 53-57.

136. Arts. 37, 53-57. Se habilitaron nuevos edificios para mantener la seguridad de los que trabajaban y asisten a los tribunales. La participación en los procesos judiciales se consideró una actividad esencial. Se flexibilizaron los plazos. Los tribunales han permanecido abiertos durante toda la pandemia y, desde luego, para impugnar la respuesta del Gobierno al COVID-19. Véase Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núms. 48 y ss., 55.

137. Art. 52.

138. Se trata, pues, de modificaciones provisionales o no permanentes. Véase Grogan, cit. en nota 130.

139. Y ello porque el control parlamentario permite la aprobación o el rechazo del reglamento, pero no su enmienda. Los reglamentos entran en vigor en el momento de su aprobación, pero han de ser aprobados en el parlamento dentro de los 28 días siguientes. Es esta una cuestión de más amplio espectro y que excede del control de los reglamentos de emergencia. Véase Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núms. 33, 34. Otra crítica se refiere a que a los ministros competentes se les permite en esta Ley aprobar «directrices» –reglamentos de menor entidad– sin control parlamentario directo. *Ibid.* núm. 28 y Parte IV.A.

140. Art. 89, 90(2).

141. Esta fue la más importante concesión arrancada durante su tramitación parlamentaria: ambas cámaras deben votar afirmativamente una moción que disponga «que las disposiciones temporales de la Ley de Coronavirus de 2020 no expiren todavía» (art. 98). Véase Jeff King, Natalie Byrom, cit. en nota 89, núm. 19.

que puedan verse afectados, así como las modalidades de control político de los reglamentos en sede parlamentaria[142]. Además, regulan las cuestiones competenciales y organizativas durante la pandemia entre los distintos niveles de poder, las relaciones interadministrativas y la colaboración privada[143].

Las leyes citadas no son, pues, meramente autorizatorias, ni están vacías de contenido, esto es, no se limitan a activar la emergencia y a ofrecer una cobertura formal[144] dejando acto seguido toda la iniciativa al Ejecutivo, sino que guían y orientan la acción del Gobierno, establecen el marco completo en el que se pueden ejercer los poderes de emergencia, cuya vigilancia y aprobación corresponde al parlamento[145]. Por lo demás, la existencia de esa legislación primaria de emergencia permite la revisión judicial de la legislación secundaria y las acciones singulares, puesto que ofrece un parámetro o referente jurídico más sólido para enjuiciar vicios de *ultra vires*, de colisión con los límites materiales, de respeto de los procedimientos establecidos, entre otros extremos.

En poco más de un año se dictaron más de cuatrocientos reglamentos relacionados con el coronavirus, sujetos a diversas formas de control y aprobación parlamentarios[146]. Con todo, y ello es expresión de una sensible conciencia jurídica y de una honda cultura democrática, se han vertido no pocas críticas por la debilidad del control político de tales reglamentos en sede parlamentaria de acuerdo con la legislación aplicada[147].

Finalmente, cabe subrayar la preocupación de las Leyes citadas por evitar la normalización de los poderes de emergencia; la regulación por ley parlamentaria de tantas cuestiones relacionadas[148]; el funcionamiento normal del poder judicial[149] y del resto de las instituciones; y el activo papel del parlamento en la lucha contra el coronavirus[150], cuando menos en términos comparativos.

3.2. Alemania

3.2.1. Introducción. La infraestructura legal previa a la pandemia del COVID-19: la Ley Federal contra las enfermedades contagiosas[151]

Antes de la irrupción de la pandemia, Alemania contaba con la Ley federal de prevención y control de las enfermedades infecciosas en los seres humanos, esto es, con la llamada Ley contra las enfermedades contagiosas, de 20 de julio de 2000[152] (en adelante, LEC), una Ley de una notable extensión y detalle[153], a la que se le encomienda la prevención y la gestión de tales enfermedades[154]. Regula de modo sistemático y con cuidada precisión los poderes ordinarios y extraordinarios que se le confieren al Ejecutivo[155], así como las medidas que es posible adoptar en prevención de las enfermedades infecciosas.

Esta Ley ha sido modificada puntualmente desde marzo de 2020 en función de las cambiantes circunstancias del COVID-19 a través de las llamadas leyes de protección de la población (en adelante, LPP)[156]. La primera LPP se aprueba el 27 de marzo de 2020 y en su virtud se exige una previa *declaración de estado de emergencia sanitaria de alcance nacional* en la Cámara baja (*Bundestag*) y, mientras ésta dure, se le atribuyen al Ministro

142. Véase Jeff King, Natalie Byrom, núm. 92 y nota 135.
143. Al margen de otras implicaciones para el gobierno local (Jeff King, Natalie Byrom, núm. 67, nota 89), es de destacar que la Ley de 2020 atribuyó autonomía en la materia a Escocia e Irlanda del Norte.
144. Que es lo que hace nuestro art. 116 CE, si bien no impide un debate sobre lo realizado (alarma) o lo que quepa realizar (excepción).
145. Ha habido, sin embargo, no pocos problemas, cuyo examen excede del propósito de esta nota. Baste observar que los mecanismos de control de los reglamentos dictados en virtud de la Ley de 1984 son muy inferiores a los normales, y desde luego, a los que establece la Ley de 2004.
146. Una minoría fueron aprobados al amparo de la Ley del Coronavirus; otros muchos lo hicieron con la habilitación de otras leyes, y siguiendo el procedimiento de urgencia de elaboración de reglamentos que regula la Ley de 1984 (art. 45R). Jeff King, Natalie Byrom, núms. 23 y 24, nota 89.
147. Por todos, Lord Sumption, «Government by decree», citado en 1.
148. Se aprobaron desde el primer momento otras leyes parlamentarias que acompañaron a las leyes de emergencia, tales como *las Contingencies Fund Act 2020*; *Corporate Insolvency and Governance Act 2020*; *Finance Act 2020*; *Stamp Duty Land Tax (Temporary Relief) Act 2020*; *Business and Planning Act 2020*. Jeff King, Natalie Byrom, 31, cit. nota 89.
149. Jeff King, Natalie Byrom, núm. 47, cit. nota 89.
150. Véase Jeff King, Natalie Byrom, núm. 31, 34, 39 y ss., 45, 48, 55, cit. nota 89. Y ello pese a que, como ha sido común en todos los países, el parlamento ha expresado sus quejas por su posición frente al Ejecutivo.
151. La elaboración de esta síntesis se basa en el estudio de la legislación, con el apoyo de la bibliografía que se cita seguidamente, en primer lugar, el estudio de Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, «Germany: Legal Response to COVID-19», en *OxConLaw*. Quiero expresar mi agradecimiento a Roman Hensel, profesor ayudante del Departamento de Derecho Público y Fundamentos del Derecho de la Universidad Humboldt de Berlín, por su amable y concienzuda orientación a fin de asegurar la fiabilidad de la presente exposición a nuestro limitado propósito.
152. *Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen*. También conocida como Ley de protección contra las infecciones. Entró en vigor el 1 de enero de 2001.
153. 77 artículos y cerca de 80 páginas impresas.
154. Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, cit. en nota 151, núm. 14.
155. En este caso, con la intervención expresa del parlamento: véanse las tres notas siguientes.
156. Hasta la fecha (julio de 2021) se han aprobado cuatro LPP, la última con fecha de 22 de abril de 2021. Cada una de ellas introduce reformas puntuales en la Ley de cabecera, esto es, en la LEC, y en otras leyes, por razón del COVID-19. Las LPP establecen cláusulas de caducidad de las reformas que introducen en la medida en que entrañan un derecho extraordinario. Las potestades reglamentarias extraordinarias atribuidas al Ministro de Sanidad mediante la aprobación del art. 5 han experimentado sucesivas reformas en más y en menos, en función de las circunstancias (se han extendido mediante nueva ley que deroga su fecha de caducidad, y puede renovarse, con la declaración de estado de epidemia del *Bundestag* cada tres meses; y se han derogado después algunos puntos del art. 5.2).

federal de Sanidad nuevas potestades reglamentarias de emergencia[157].

El modelo alemán, pues, combina, de un lado, la existencia de esta completa *Ley general contra las enfermedades infecciosas* –sucesiva y puntualmente reformada desde marzo de 2020– con la *activación parlamentaria de las potestades extraordinarias* que se le asignan temporalmente al Ejecutivo, de otro, mediante la citada declaración de emergencia[158].

3.2.2. *Potestades ordinarias y extraordinarias en la LEC*

a) En la LEC son distinguibles las medidas *singulares* y las *generales*. Unos artículos, señaladamente los 28-31, prevén las típicas restricciones de carácter individual que pueden establecerse, sea mediante acto administrativo singular o general[159], y otros, como el art. 5[160] o el 32[161], habilitan para aprobar reglamentos sanitarios.

   Ello significa que la LEC no rebaja sus exigencias desde la perspectiva del principio de legalidad y de la reserva de ley en relación con las medidas singulares –que aparecen densamente reguladas–, ni se limita a habilitar la injerencia respecto de cada uno de los derechos fundamentales afectados, sino que delimita con claridad el presupuesto de hecho y las consecuencias jurídicas en cada caso anudadas[162]. Las injerencias individuales han de ser entendidas como ejercicio de potestades *ordinarias*.

b) La potestad reglamentaria se halla sujeta a una compleja regulación en la LEC.

   De un lado, cabría hablar de una potestad ordinaria de los *Länder* para aprobar reglamentos (ejecutivos) en las mismas materias y derechos a que se refieren los citados arts. 28-31 LEC[163], observando sus presupuestos y límites[164], es decir, se trata de normas de carácter general y cuyo objeto es la *aplicación* o implementación de esos preceptos legales[165].

   De otro, es posible identificar potestades reglamentarias *extraordinarias* otorgadas durante la pandemia y mientras dure la declaración de emergencia, bien (limitadamente) a los *Länder*[166], o bien al Ministro Federal de Sanidad[167], y que se pueden extender con carácter preventivo a las personas sanas. Estas potestades extraordinarias han sido objeto de enorme atención, repetidas reformas y controles[168] y no se otorgan de modo genérico o indiferenciado, sino que se matizan en función de la materia[169], del derecho afectado[170], de las circunstancias[171], o de las competencias[172].

157. Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, cit. en nota 151, núm. 16 (véase el extenso art. 5 y la nota anterior).
En noviembre de 2021 se modificó el art. 28a7 LEC para concretar qué medidas podrían aún adoptarse, pese a la terminación de la emergencia sanitaria de alcance nacional. Así, por ejemplo, se determina que a partir de esa fecha podrían adoptarse medidas como las relativas a la distancia social, la obligación de llevar una mascarilla de protección respiratoria de una clase específica, la presentación de un certificado de vacunación, la realización de ciertas prácticas de higiene en concretos establecimientos, la restricción del número de personas en ciertos espacios, etc. Es la ley, en suma, tal es lo que aquí interesa resaltar, la que establece el marco jurídico que luego corresponderá al Ejecutivo implementar, aun cuando este deba contar con un amplio margen de apreciación.
158. *Ibid.* núm. 8-9: el estado de emergencia no puede ser declarado formalmente a nivel constitucional, y los derechos fundamentales no pueden ser suspendidos ni siquiera en tiempos de pandemia. La Constitución quiere estar por encima. Y ello porque el estado de emergencia constitucional jugó un papel decisivo en la destrucción de la República de Weimar.
159. Se centran en las personas contagiadas o sospechosas de estarlo (art. 28), y permiten medidas como el confinamiento individual, el sometimiento a observación (art. 29), la cuarentena (art. 30) o la prohibición total o parcial de ejercer actividad profesional (art. 31). En cada caso, y de modo diferenciado, se concretan qué derechos pueden ser limitados. Mientras el art. 28 sirve de entrada a las medidas de protección, los arts. 29-31 lo especifican. Los actos administrativos a su vez no hacen sino concretar y aplicar sus determinaciones. Estos preceptos, en particular el 28 y el 32, han sido modificados puntualmente a través de las citadas leyes LPP (nota 156).
160. Véase la nota 156.
161. Este precepto ya establecía antes de la pandemia una potestad reglamentaria ordinaria en favor de los *Länder* (al que la ulterior reforma del art. 28.a.5 para tiempos de pandemia le ha añadido ciertos requisitos adicionales), en la medida en que se trataba de reglamentos «normales» (esto es, ejecutivos), limitados a aplicar los preceptos legales a los que se ciñe (28-31), de ordinario ideados para personas enfermas o sospechosas de contagio. Véase *supra* núm. 1.
162. Nota 159. Las medidas singulares de restricción de derechos fundamentales, pues, como sucede con el modelo británico, no quedan abandonadas a una cláusula general simplemente habilitadora.
163. Nota 161.
164. Art. 32 en su versión anterior a la primera LPP de 27 de marzo de 2020. Véase nota 161.
165. Preceptos que no se limitan a *habilitar* las injerencias, sino que contienen una cuidada *regulación*, como se ha notado. Véanse por otra parte las notas 151 y 164. De hecho, antes de la pandemia no se prestaba especial atención a la habilitación que contiene el art. 28.1 (que permite adoptar «las medidas necesarias de protección», aunque insertas en un contexto y entramado definido). Se trataba de una habilitación centrada en las personas infectadas o sospechosas de estarlo. Puede decirse, como opina Roman Hensel, que durante la pandemia el Ejecutivo ha «descubierto» la posibilidad de proyectar esas medidas a personas sanas.
166. Art. 28.a y 32. En su virtud pueden incidir también sobre las 17 materias que enumera (que no constituyen, sin embargo, un *numerus clausus*), y que resultan aplicables a las personas sanas (1). Están sujetos a una vigencia temporal de 4 semanas y a la obligación de motivar su necesidad (5). Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, cit. en nota 151, núm. 20. No se pueden separar de las leyes, como sucede con la potestad del Ministerio Federal (nota 156). En la práctica se ha hecho un mayor uso de esta potestad, que de la del Ministro Federal.
167. Nota 156.
168. Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, cit. en nota 151, núm. 25-32, 45-46.
169. Art. 5, 32.
170. Arts. 28-31.
171. P. ej., reglas especiales para personas vacunadas.
172. P. ej., en casos especiales el reglamento federal puede adoptar medidas de protección uniformes para todo el país (art. 28.b).

c) Por lo demás, la atenta protección de los derechos fundamentales se deja sentir a lo largo de toda la LEC, y no solo con ocasión de la adopción de medidas singulares o generales, de potestades ordinarias o extraordinarias. Baste destacar que, mientras se mantenga la declaración de emergencia, se ha de respetar la diferenciación y gradación en las restricciones de los derechos fundamentales a los efectos de la LEC, de modo que, por ejemplo, en las condiciones establecidas, las relativas al derecho de reunión, de asamblea (de carácter ideológico o religioso) y las que afectan a la libertad de culto solo se permiten como última ratio[173]. Igualmente cabe subrayar que la LEC dispone por sí misma los umbrales en virtud de los cuales se pueden activar determinadas medidas[174]. Por otra parte, las restricciones a la libertad de movimiento y la obligación de permanecer en casa fueron objeto de ponderadas regulaciones a lo largo del tiempo, por el efecto multiplicador que esas medidas irrogan. Así, se establecieron con una cierta flexibilidad en términos comparativos (se admitían, por ejemplo, entre otras razones imperiosas, los deportes y actividades físicas al aire libre realizados en solitario, con los miembros de la propia familia o con otra persona)[175]; y, por lo mismo, las restricciones a salir de casa durante determinadas franjas horarias o por concretos motivos solo podían aplicarse como último recurso[176].
d) Las cuestiones competenciales y de organización administrativa, en fin, han sido contempladas expresamente en la LCE y en las LPP[177].

3.2.3. La Sentencia constitucional sobre el deber del legislador de proteger la vida y de evitar la discriminación de las personas discapacitadas en el triaje

La Sentencia de la Sala Primera del Tribunal Constitucional Federal, de 16 de diciembre de 2021[178], se ocupa del derecho a la vida (art. 2.2)[179] y el derecho a la igualdad (art. 3.3)[180], en situaciones de triaje[181], señaladamente cuando entran en escena, en ese reparto de la escasez dentro del sistema de salud, personas con discapacidad. El Tribunal entiende que son personas que corren mayor riesgo de contraer el COVID-19 por su situación de dependencia de terceros. Y el mensaje es concluyente: es al legislador, y no al personal sanitario, sostendrá la referida Sentencia, al que incumbe establecer los criterios y adoptar las medidas necesarias para su protección.

El problema de fondo que en este caso se suscita consiste precisamente en la inacción del legislador. Pese a la existencia de ciertas medidas legales, la ley no había dispuesto un marco jurídico *vinculante* que protegiera de forma *suficiente* a las personas discapacitadas. De acuerdo con la Sentencia, el mandato de protección de los discapacitados por parte del legislador puede desembocar en deberes específicos y concretos, adquiriendo una particular intensidad en presencia de los derechos fundamentales, como sucede, desde luego, cuando se trata de proteger el derecho a la vida[182]. Es el legislador democrático el principal y primer responsable, no el Ejecutivo, los jueces, o los profesionales a través de sus recomendaciones.

La Sentencia es relevante a nuestro propósito porque hace emerger de nuevo el *deber de legislar* y pone de manifiesto una vez más que la libertad y los derechos más básicos no solo pueden verse lesionados por una injerencia desproporcionada (o carente de base normativa suficiente), sino también por una insuficiente protección a consecuencia de la omisión del poder legislativo. La Constitución prohíbe el exceso de la injerencia (principio de proporcionalidad o prohibición de exceso), pero también la insuficiente (prohibición de defecto). Está vedada la injerencia sin ley previa (principio de legalidad,

173. Art. 28.a(2).
174. Art. 28a(3). Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, cit. en nota 151, núm. 30.
175. *Ibid.*, núm. 59 y ss.
176. *Ibid.* Art. 28a(2) n.º 2).
177. Desde la atribución de nuevos poderes al Ministerio de Sanidad (Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, cit. en nota 151, núm. 16, 36), hasta la coordinación federal de las medidas cuando se superen determinados umbrales (*ibid.* núm. 30, art. 28a.3); pasando por nuevas normas en materia de urbanismo en relación con las instalaciones para acoger a enfermos, o las funciones de las instituciones científicas (art. 4: Instituto Robert Koch).
178. *1 BvR 1541/20*. Un comunicado de prensa en inglés sobre esta Sentencia en https://www.bundesverfassungsgericht.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/EN/2021/bvg21-109.html (visitado en enero de 2022).
179. «Toda persona tiene derecho a la vida y a la integridad física».
180. El art. 3.3 proscribe el trato discriminatorio. El último inciso especifica que nadie podrá ser discriminado por razón de su discapacidad física o psíquica.
181. Recuérdese que la RAE, aceptando el término, lo describe como «clasificación de los pacientes según el tipo y gravedad de su dolencia o lesión, para establecer el orden y el lugar en que deben ser atendidos».
182. La Sentencia razona que si en el transcurso de la pandemia surge la necesidad de realizar un triaje, los médicos que atienden a los pacientes se enfrentarán a una situación en la que tendrán que tomar decisiones extremas. Y habrán de decidir cómo se asignan los recursos de cuidados intensivos disponibles, es decir, quién debe recibir tratamiento y quién no. En ese contexto, el riesgo de que se aborde la cuestión sin incurrir en discriminación es cierto, porque es fácil que se tenga en cuenta la condición de estos más allá de las posibilidades de sobrevivir al episodio médico agudo. Ese riesgo no está conjurado en las disposiciones legales en vigor.
De nuevo en este caso (véase *supra* núm. II.4) el Tribunal sostiene que el legislador dispone de un amplio margen para diseñar el marco jurídico de protección que tenga por conveniente, lo que en paralelo implica un control judicial limitado a la hora de determinar si el legislador ha infringido el mandato de protección. El Tribunal Constitucional podrá concluir en la violación de este mandato positivo si el legislador no ha adoptado ninguna medida de protección, o las adoptadas resultan manifiestamente insuficientes o intrínsecamente inadecuadas para lograr la protección exigible.

reserva de ley), pero también la desprotección por omisión de la ley.

3.3. Un balance sobre el principio de legalidad en la lucha contra la pandemia

A nuestro limitado propósito, el recorrido por estos ordenamientos es suficiente para destacar dos observaciones[183]. Primera, que el principio de legalidad y la reserva de ley –en cuanto expresión de la *democracia parlamentaria*– se extienden a todos los aspectos relacionados con la lucha contra las enfermedades contagiosas, habida cuenta la trascendencia de las cuestiones en juego (derechos fundamentales, fuentes, competencias, vida económica y social...)[184]. Y, segunda, que el entendimiento que de tales principios se hace en el Reino Unido[185] y en Alemania[186] no es exótico o ajeno a nuestra cultura jurídica, sino que por el contrario resulta de todo punto de vista exigible en nuestro ordenamiento jurídico[187].

Por razones de espacio no es posible detenerse aquí en otros ordenamientos, como el francés, que se mueven en igual dirección[188]. Baste notar que en Francia existía una clara infraestructura legal para la lucha contra las enfermedades infecciosas (el Código de Salud Pública) cuando irrumpe la pandemia. Así y todo, destaca la diligente aprobación parlamentaria –el 23 de marzo de 2020 por vía de urgencia– de una densa Ley especial contra el COVID-19 (la Ley 2020-290)[189], que lo completa y se inserta en el citado Código. Además, es el parlamento, mediante esa misma Ley, el que declara la emergencia sanitaria[190]. En suma y al igual que en el caso alemán y británico, pese a disponer de una legislación moderna, ésta se actualiza de inmediato frente al COVID-19, sin que la ley se limite a autorizar, esto es, a activar los poderes de emergencia atribuibles al Ejecutivo, para establecer el marco jurídico completo, previniendo –a través de la declaración parlamentaria de emergencia sanitaria– cómo, cuándo y en qué condiciones se ejercen tales poderes, siendo variadas las formas de dirección y control del parlamento[191].

4. LA QUIEBRA DEL PRINCIPIO DE LEGALIDAD Y DE LA RESERVA DE LEY EN EL ORDENAMIENTO ESPAÑOL EN LA LUCHA CONTRA EL COVID-19

4.1. La ausencia de una ley de lucha contra las enfermedades contagiosas

Dos diferencias notables saltan a la vista, pues, con otros países de referencia: primera, nuestra infraestructura legal de partida cuando surge la pandemia, no una gripe

183. Dejamos ahora fuera otras enseñanzas. Baste constatar, sin embargo, que la pertinaz omisión de las Cortes Generales en la lucha contra el COVID-19 no tiene paralelo en términos comparados: por todos, *OxConLaw* («Legal Response to COVID-19»). Asimismo, notas 57 y 68.
Respecto de países con un punto de partida y una estructura constitucional con ciertas analogías, como Portugal e Italia, es suficiente con notar aquí que el primero ha renovado al menos cada quince días durante el estado de emergencia la intervención parlamentaria, sin perjuicio de la aprobación de una ley específica; y en relación con el segundo que la configuración constitucional del decreto-ley no padece del déficit democrático del nuestro (baste recordar el art. 70, párrafo primero, y el 77 de la Constitución italiana).

184. Sean estas de derecho ordinario o del extraordinario; se refieran a las potestades ordinarias o a las extraordinarias; se trate de medidas singulares o generales; y, en fin, a cualesquiera otras materias fundamentales conexas.

185. Nota 1.

186. En síntesis, expresado en la doctrina de la esencialidad, en cuya virtud todas las cuestiones esenciales relacionadas con el ejercicio de, y las injerencias sobre, los derechos fundamentales han de ser reguladas mediante ley formal. Se trata de una genérica reserva de ley, que, de acuerdo con su Tribunal Constitucional, hunde sus raíces en el principio del estado de derecho y el principio democrático (reserva parlamentaria), que se extiende más allá de los derechos fundamentales. Esta doctrina se concreta en la propia Constitución (art. 80), al exigir unas condiciones para la habilitación legal de los reglamentos, así como su control. De la ley, en otras palabras, se ha de desprender cuál es el «programa» legal que el reglamento ha de alcanzar. Por lo demás, conocida es también la doctrina de la certeza y calidad de la ley parlamentaria.

187. Nota 58 y IV.1.
De acuerdo con tales criterios, no se acepta una cláusula habilitante como la que luce en el art. 3 Ley 3/1986, ni tan siquiera como precepto central para las (pocas) restricciones singulares de derechos fundamentales que en conjunción con otros preceptos puede soportar: notas 5 y 6; *infra* IV.1 y 2.
Por lo demás, y pese a la enorme distancia que nos separa de la práctica constitucional seguida en estos países, no está de más notar que, así y todo, ha sido objeto de sólidas críticas reivindicando justamente una mayor observancia de las exigencias constitucionales en lo que hace al papel del parlamento. Respecto de Gran Bretaña, baste remitirnos a la nota 1. Por lo que hace a Alemania, véase «Why Constitution matters – La ciencia del derecho Constitucional ante la crisis del coronavirus», Hans Michael Heinig, Thorsten Kingreen, Oliver Lepius, Christoph Möllers, Uwe Volkmann, Hinnerk Wißmann; Gustavo Manuel Díaz González (traductor), *Revista de Derecho Público*, vol. 3, 2021, pp. 129-156 (en línea).

188. Por todos, véase E. Chambas, T Perroud, cit. nota 57.

189. https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000041746313 (diciembre de 2021).

190. También podía haberlo hecho el Consejo de Ministros mediante decreto, según el Código de Salud Pública, cuando concurra una catástrofe sanitaria que amenace la salud pública. *Cf*. E Chambas, T Perroud, «France: Legal Response to COVID-19», cit. nota 57.

191. La Ley habilitó al Gobierno para adoptar la legislación secundaria necesaria, a través del mecanismo de las ordenanzas previsto en el art. 38 de la Constitución, para hacer frente a las consecuencias financieras y sociales de la crisis y salvaguardar la economía nacional. El parlamento en este caso ejerció el control sobre la acción del Gobierno a través de dos vías. De un lado, durante la emergencia sanitaria, el Gobierno ha debido informar al parlamento de cualquier medida que promulgara. De otro, mediante la prórroga mediante ley del estado de emergencia.
Por otra parte, la Ley 2020-290, y más tarde la Ley 2020-1379, también permitieron al Parlamento delegar parte de su poder legislativo en favor del Gobierno durante tres meses a través del mecanismo de las ordenanzas previsto en el art. 38 de la Constitución.
Con esta delegación, el parlamento especificó detalladamente qué competencias quería delegar en el Ejecutivo durante un plazo determinado. Técnicamente, esta delegación puede ser revocada en cualquier momento con una nueva ley. Además, como las ordenanzas deben ser ratificadas por ley, el parlamento tiene la última palabra para controlar este proceso. *Cf*. E. Chambas, T. Perroud, «France: Legal Response to COVID-19», cit. nota 57.

estacional, era –y es– mucho más precaria, por no decir inexistente, en lo que hace a los poderes de emergencia sanitaria (ordinarios y extraordinarios); y, segunda, las Cortes Generales no han compensado ese déficit con un marco jurídico capaz de hacer frente a una situación de excepcionalidad histórica[192].

Que el art. 3 de la Ley 3/1986 no es una ley contra las enfermedades contagiosas no requiere mayor análisis[193]. Hablar de «legislación sanitaria» –en materia de infecciones– no deja de ser un puro eufemismo[194]. La forzada comparación, deslizada en ocasiones, entre las Leyes británicas y alemanas con nuestra legislación no requiere mayor comentario a la vista del análisis precedente.

4.1.1. Inexistencia de una ley de enfermedades infecciosas que se active y conecte con el estado de alarma

Como se ha notado, el derecho extraordinario (en nuestro caso, el art. 116 CE y la LOAES) no cuenta con el apoyo y la colaboración de una regulación específica en materia de salud pública[195]. La respuesta al COVID-19 se ha basado sustancialmente en reglamentos, que no implementan, nótese bien, una legislación primaria (por inexistente), sino que se aprueban por la autoridad competente sin referente legislativo[196]. Ello ha ocurrido en tiempos de alarma, bajo cuya declaración y cobertura se ha hecho necesario por tanto el dictado de las normas sanitarias correspondientes para cada tiempo y lugar. Y también ha sucedido sin alarma, sobre la ficción de que esos pocos preceptos aislados de la legislación sanitaria constituirían, primero, *una ley contra las enfermedades infecciosas* y, además, *una ley habilitadora* y *reguladora de potestades ordinarias y aun extraordinarias*, siendo así que la pretendida conversión del insustancial art. 3 Ley 3/1986 en una «ley de plenos poderes» choca con todos los parámetros fundamentales[197].

Por consecuencia, los Ejecutivos han podido decidir libremente –sin directriz *legislativa* alguna, sea o no con la cobertura de la declaración del estado de alarma– si el objetivo era salvar vidas o evitar el colapso de las UCIs, por poner un ejemplo entre decenas[198]. O la autoridad sanitaria –o más sencillamente el sistema de salud– ha podido decidir sin más directa o indirectamente triajes o prelaciones de unos colectivos sobre otros, como en caso de las residencias de ancianos. Sostener, con argumentos formales, que el pueblo se habría pronunciado en tal sentido a través de un art. 3 Ley 3/1986 no requiere mayor análisis[199].

Por lo demás, el control judicial resulta en ese contexto poco menos que inasible –salvo que el Ejecutivo incurra en un patente «error del sistema» o de bulto–, ya que la medida queda a la pura creatividad de la autoridad y tiene en sede judicial un difícil contraste por falta de parámetros concretos[200].

4.1.2. Manifiesta insuficiencia del derecho ordinario contra las enfermedades infecciosas

Por decirlo en términos muy simples: tres preceptos legales[201] no hacen una ley contra las enfermedades infecciosas, ni son capaces siquiera de representar *una legislación reguladora de las potestades ordinarias*, en la lucha contra enfermedades infecciosas[202]. De ahí que solo haciendo una interpretación excesivamente expansiva del principio de legalidad (y de la reserva de ley), hasta romperlo virtualmente, pudo aceptarse, con la ayuda del art. 8.6 de la LJCA[203], que el art. 3 Ley 3/1986 –y siempre

192. A juzgar por la Proposición de Ley Orgánica de medidas especiales en materia de salud pública con el fin de controlar enfermedades transmisibles, presentada por grupo parlamentario de la oposición (BOCG. Congreso de los Diputados, núm. B-161-1 de 23/04/2021, p. 1), el entendimiento de la función legislativa, limitada a añadir unas pocas líneas a una Ley 3/1986 tan insustancial como obsoleta, está muy lejos de satisfacer las exigencias constitucionales.

193. La conclusión cabe hacerla extensiva a las leyes citadas en nota 10, aunque ofrezcan una mayor expresividad para actuaciones menores. No se olvide que para cumplir con la reserva de ley en materia de derechos fundamentales no basta con habilitar (expresamente) la injerencia, sino que se ha regularse el derecho afectado, las condiciones, el procedimiento, la organización y la competencia, la temporalidad, los controles... (véase *supra* III y V).

194. Nota 10.

195. Es decir, no hay una regulación dentro de la propia LOAES, ni fuera de ella, a la que quepa remitirse mediante la declaración de alarma (I y II.1).

196. No se trata, pues, de reglamentos ejecutivos, como es evidente.

197. Baste notar, por vía de síntesis, que las supuestas potestades de emergencia sanitaria que atribuiría no estarían sujetas a condición, requisito, procedimiento o criterio sustantivo alguno. Nada se dice en la Ley 3/1986 de la potestad reglamentaria de emergencia –si es genérica e indeterminada o se modula en función de la materia sobre la que verse–; de la vigencia temporal de esos reglamentos; del procedimiento de elaboración –siquiera sea de urgencia–; de la concreta autoridad que los pueda aprobar; de los límites sustantivos en relación con los derechos afectados (no es lo mismo imponer una distancia social que un horario de confinamiento y un cierre perimetral), ni de las típicas medidas de protección que pueden adoptarse; de cómo desplazan y en qué condiciones los reglamentos a las leyes, en qué manera se alteran las competencias... Sencillamente, porque no sirve, ni puede servir, para ello.

198. En contraste, por ejemplo, con la Ley federal alemana, que se pronuncia expresamente por la conjunción de ambos objetivos y a tal fin establece los concretos umbrales que permiten la entrada en escena de las distintas medidas –art. 28.a(3)–.

199. Véanse las expresivas palabras de contrario recogidas en la nota 1.

200. Véase I.2 y 3, y IV.2.

201. Nota 10.

202. Ciertamente, aunque se hable del número de preceptos por ser gráficos, no se trata de una cuestión de cantidad. El simple cotejo de esos preceptos con la legislación comparada citada (núm. III) habla por sí sola. No se hacen aquí en ningún caso distinciones sutiles acerca de una mayor o menor densidad normativa de la ley. Se habla, por el contrario, de un supuesto grosero y sin paralelo.

203. El precepto disponía entonces, en el contexto de intervenciones singulares, como la autorización de entrada en domicilio, que «corresponderá

y cuando se conecte con los otros dos preceptos en materia sanitaria[204]–, podría cubrir las restricciones *singulares* o *individuales* de los derechos fundamentales en las que pueda hallar algún *apoyo expreso*, *nunca limitaciones generalizadas*.

Y ello porque, aun para una limitación singular de un derecho fundamental, una cláusula abierta como la que luce en el reiterado art. 3 Ley 3/1986 resulta inaceptable: en términos generales, tan solo cabría asumir una previsión indeterminada como broche de cierre de una larga relación de supuestos en los que se inserte y en cuyo contexto se interprete, pero no como una aislada habilitación genérica[205], justamente para evitar, como ha ocurrido, que se convierta en un comodín[206]. Ha de insistirse, en fin, en que también el derecho ordinario –a través de una ley contra las enfermedades infecciosas– ha de reunir ciertas garantías elementales[207].

4.2. La jurisprudencia del tribunal supremo en «casación» sobre ratificación de medidas de carácter general

a) De cuanto ha quedado dicho se impone por sí sola una severa crítica a la primera Sentencia del Tribunal Supremo (TS) recaída en la nueva «casación» –de 24 de mayo de 2021[208]–, que es de esperar sea revisada y superada, bien por el propio TS, o bien por el Tribunal Constitucional por más de un concepto[209], cuando concluye, en lo que ahora interesa, que la legislación sanitaria[210] ofrece suficiente precisión para satisfacer la exigencia de certeza que ha de tener una ley para fundamentar las restricciones de los derechos fundamentales[211].

b) Consistiendo la función del TS en esta clase de procedimiento, según la Sentencia, en verificar en primer término la habilitación normativa[212], cabría esperar, sin embargo, una cadena argumental más sólida y una mejor defensa del principio de legalidad y de la reserva de ley[213], que, a nuestro juicio, han estado

a los Juzgados de lo Contencioso-administrativo la autorización o ratificación judicial de las medidas que las autoridades sanitarias consideren urgentes y necesarias para la salud pública e impliquen privación o restricción de la libertad o de otro derecho fundamental». Luego sería ligeramente modificado por la disposición final 2.1 de la Ley 3/2020, de 18 de septiembre, para ser aún más claro y para diferenciarlo de las medidas generales que la reforma procesal pretendió legitimar (*supra* II.2.2.c).

204. Nota 10.

205. Véase nota 1 y núm. III. La polémica jurídica ha sido muy superior en otros países en supuestos de mucha menor indeterminación. Respecto de Alemania, si bien referido a la potestad reglamentaria, véase Anna-Bettina Kaiser, Roman Hensel, cit. en nota 151, núm. 25, 45-46. Allí el art. 28.1 LEC permite adoptar las «medidas de protección necesarias», aunque en un contexto y una delimitación de supuestos de hecho y consecuencias jurídicas de una notable densidad. En Italia, el Decreto-ley 6/2020, de 23 de febrero, preveía en su art. 1 una serie de medidas restrictivas sobre derechos (fundamentales y no fundamentales), que podrían adoptarse en caso de necesidad (la lista llega a establecer hasta 16 supuestos). Y en ese contexto se establece una cláusula abierta, mucho más cerrada que nuestro art. 3 Ley 3/1986: cuando exista un caso positivo que no pueda ser rastreado procedente de una zona ya afectada por el contagio del COVID-19, las autoridades competentes deberán adoptar todas las medidas de contención y gestión que sean adecuadas y proporcionadas a la evolución de la situación epidemiológica. Y así y todo fue «fuertemente cuestionada» lo que motivó su derogación un mes después por Decreto-ley 19/2020, de 25 de marzo, si bien con algunos matices se ha mantenido en su conversión en Ley de 5 de marzo de 2020, n. 13.

206. En definitiva, si normalizar un estado de alarma degradado y vacío de contenido resulta de todo punto indeseable, aún más lo es normalizar el ejercicio de potestades extraordinarias sin base jurídica (sin habilitación legislativa, ni declaración parlamentaria y sin regulación legal específica), o normalizar el ejercicio de potestades ordinarias, aunque estén referidas a medidas singulares, por carecer de ley, y que nos retrotraen muy atrás en el tiempo y nos alejan de países de referencia (véase en tal sentido la nota 153).

207. *Supra* I.4 y III.

208. Tribunal Supremo, Sala de lo Contencioso-Administrativo, Sección Cuarta, Sentencia núm. 719/2021. La Sentencia hace frecuente remisión a los autos dictados el 20 de mayo de 2021; también al de 24 de marzo de 2021, de la Sección Primera, sobre los nuevos arts. 10.8 (y 11.1.i) LJCA.
Es, a nuestro juicio, una Sentencia plana, que rehúye las cuestiones fundamentales, y que en su recorrido deja afirmaciones, en realidad un tanto apodícticas, poco convincentes, con efectos trascendentales, validando la abdicación parlamentaria a la que asistimos.

209. En primer término, desde luego, por la perniciosa doctrina sentada *pro futuro* sobre el principio de legalidad en general y la reserva de ley en particular, máxime en el ámbito de los derechos fundamentales (y no solo: I.2.2), y en el contexto de máxima tensión del ordenamiento.
A ello se añaden otros aspectos capitales que quedan fuera de nuestra consideración, tales como el grave problema constitucional que implica confiar a los jueces y tribunales, vía «ratificación», una función cuasi-normativa, sobre la ya existía cuestión de inconstitucionalidad planteada, y que el TS dice conocer pero que orilla por completo (implícitamente ha de entenderse que no existe para este duda positiva para plantear cuestión de inconstitucionalidad) (f.j. 4); o el hecho, no menor de que este nuevo recurso de casación sea atribuido mediante decreto-ley, que, por otra parte, decide desde cuándo puede interponerse, lo que permite influir sobre los casos que conoce.
Poco convincente, en fin, resulta el razonamiento sobre la naturaleza de esta modalidad de casación y sobre el interés casacional objetivo (f.j. 4.C y 5.A). Las alegaciones que de contrario hace el Ministerio Fiscal, en particular su conclusión, son compartibles (f.j. 3).

210. Nota 10.

211. *Cf.* f.j. 4.D. No advierte por otra parte que bajo su pretendida cobertura los Ejecutivos ejercen además potestades que van más allá de las limitaciones de los derechos fundamentales. Como se ha insistido, no todo versa, como sugiere la Sentencia, sobre «la forma de prevenir la enfermedad... mediante medidas que comportan limitaciones de derechos fundamentales» (*cf.* f.j. 4.C): *supra* I.2.2.
Por otra parte, y en contra de lo que parece sugerirse en la citada Sentencia, la certidumbre o certeza no es el valor último que subyace al principio de legalidad y a la reserva de ley (*infra* V y notas a pie de página).

212. El TS, afirma la Sentencia, solo puede ejercer en este procedimiento de ratificación un juicio muy limitado, centrado primero en comprobar que existe la imprescindible habilitación normativa (.j. 4.B: habría de decirse mejor habilitación «legislativa»), ya que la ratificación –entendida como acto aprobatorio previo (f.j. 4.A), no la sustituye. El acuerdo de ratificación no impide el eventual y ulterior control pleno de la jurisdicción contencioso-administrativa. La ratificación no predetermina el fondo (*cf.* f.j. 4.B).

213. La Sentencia (f.j. 4.D), antes de concluir que la suma de los tres artículos en liza (nota 10) satisface las exigencias constitucionales se limita a hacer dos afirmaciones básicas: los derechos fundamentales no son absolutos y no toda restricción ha de operarse mediante ley orgánica.

tutelados en ocasiones con más rigor por órganos jurisdiccionales inferiores.

El método y argumentación de la Sentencia resultan planos y sin relieve. De entrada, reconoce que «se trata de saber si esas leyes, que no previeron circunstancias como las que estamos atravesando, permiten o no restringir la libertad de circulación que es la que viene en causa en este recurso»[214], lo cual debiera haber llevado a la inmediata conclusión de negarle todo fundamento y cobertura porque a los derechos fundamentales no se les puede restringir sin previsión legislativa, de modo *implícito* o *supuesto*, como aquí sucede[215]. Ello no le impedirá, sin embargo, al Tribunal Supremo sostener que la restricción de la libertad de circulación tiene amparo en una disposición legal que no la ha previsto[216].

La Sentencia rebaja, en suma, los requerimientos del principio de legalidad y de la reserva de ley al nivel más bajo imaginable: así y dado que las tres disposiciones legales en cuestión[217] no apoderan a la autoridad sanitaria «para cualquier cosa en cualquier momento»[218], ese «conjunto de preceptos»[219], concluye, ofrece «suficientes precisiones objetivas, subjetivas, espaciales, temporales y cualitativas para satisfacer las exigencias de certeza que han de tener los preceptos que fundamentan restricciones o limitaciones puntuales de derechos fundamentales» (*sic*)[220], y, en concreto y sin mayores matices[221], «de la libertad de circulación»[222]. En la misma línea, pero con más crudeza aún y precisión en su alcance, se expresa una Sentencia ulterior[223], que considera que el art. 3 Ley 3/1986, por sí solo (y ya sin el auxilio de esos otros dos preceptos legales), da cobertura suficiente para extender las medidas restrictivas a personas sanas, es decir, a toda la colectividad[224], y que consistan en el «toque de queda» o el límite máximo de personas en las reuniones familiares y sociales (con afectación de los derechos fundamentales de los arts. 18, 19 y 21 CE)[225].

Sin embargo, y de contrario, cabe reiterar que una cosa es que quepan restricciones de derechos fundamentales fuera del estado de alarma y otra, muy distinta, que estas puedan establecerse al amparo de cláusulas genéricas que ninguna mención o referencia hacen a los derechos fundamentales y que, además y con toda obviedad, no están pensadas para afectar a toda la población. Las reglas interpretativas aquí son otras[226]. A la Sentencia le falta además perspectiva: también el derecho ordinario –en la lucha contra

---

Afirmaciones de partida sin duda compartibles, pero que requieren un desarrollo en relación con el caso planteado, puesto que de tal premisa no se sigue sin más la licitud del caso enjuiciado. Ese avance lo hace, en lo que a la ley orgánica se refiere, la siguiente STS, la 788/2021, de 3 de junio, en su f.j. 7, para negar la necesidad de tal carácter. En contra, véase la nota 57.

214. *Cf*. f.j. 4.D.

215. *Supra* IV.1 y 2.

216. Y ello mediante una doble sucesión argumental: las cláusulas abiertas no son un cheque en blanco –no permiten cualquier cosa, algunas directrices contienen–, de un lado y, de otro, las restricciones o limitaciones no se pueden predeterminar siempre (*ibid.*).

De nuevo (*vid*. nota 213), cabe compartir ambas afirmaciones elementales. Lo que sucede es que de ellas no se sigue que las medidas restrictivas encuentren por ello la suficiente cobertura legal. Es cierto que la indeterminación legal no es total –la finalidad genérica de protección de la salud, la gravedad o la urgencia de las circunstancias están aludida en la Ley en cuestión–. Ello no significa, sin embargo, que la Ley 3/1986 cumpla con los parámetros de la reserva de ley (sea orgánica u ordinaria) que exige la citada STC 76/2019 y que se desprenden de nuestra tradición constitucional y cultural (*supra* III).

217. Recogidas en la Sentencia. Son las que se citan en la nota 10 y a las que se ha hecho referencia antes en IV.1.2.

218. *Cf*. f.j. 4.B. En ello insiste después: los preceptos examinados no «adolecen de tal indeterminación que permitan hacer cualquier cosa a las Administraciones que los utilicen» (*sic*). Que existan algunas precisiones y no sean un referente normativo vacío de todo contenido, no significa que cumpla las exigencias del principio de legalidad y de la reserva de ley (IV.1). Baste la comparación con los modelos enunciados en III.

219. F.j. 4.D. Recuérdese que los tres preceptos hacen referencia primariamente, en línea con la tradición, a personas enfermas y en contacto con ellas (también a cosas e instalaciones vinculadas), y, por tanto, a medidas singulares. *Supra* I. Aquí, sin embargo, se están enjuiciando medidas generales.

220. Se confunde, a nuestro juicio, la inexistencia de un «cheque en blanco» con la satisfacción del principio de legalidad y de la reserva de ley. Planea la idea de «certidumbre» como valor subyacente, entendiendo por tal que la restricción –por grave o generalizada– sea reconducible en términos lógicos al precepto en cuestión. Se opera de nuevo *per saltum* (*vid*. notas 213, 216).

221. Habría de buscarse un nexo entre esos preceptos y la libertad de circulación (general). Habría que demostrar que estos preceptos autorizan a adoptar medidas generales para la población sana. Habría que explicar por qué estos reglamentos pueden desplazar a las leyes. Habría que argumentar por qué no ha de tener carácter orgánico la regulación legal de las restricciones de una libertad tan básica, de la que se siguen tantas otras. Etc. Indemostrado queda, en fin, que de hecho los reglamentos en cuestión sean derecho ordinario.

222. F.j. 4.D.

Para convencer(se) de que los tres preceptos legales en liza dan cobertura para lo que se está haciendo afirma que «no es una novedad que los tribunales deban extraer del ordenamiento jurídico los criterios para resolver problemas que no han recibido una solución precisa por parte del legislador» (f.j. 4 *in fine*).

Sin embargo, la interpretación judicial nunca suple las exigencias del principio de legalidad y de la reserva de ley. No compensa el déficit democrático. De nuevo, identifica la Sentencia el principio de legalidad con el valor «certeza» (notas 211, 220, *infra* V y notas a pie de página), razón por la cual el Tribunal considera que puede contribuir a integrarla.

223. STS 788/2021, de 3 de junio.

224. *Ibid.* f.j. 6.

225. *Ibid.* f.j. 7.

226. *Supra* IV.1 y 2. En resumen, no se entiende cómo el art. 3 Ley 3/1986 puede superar el test que la STC 76/2019, f.j.5, citada en la misma STS, establece en relación con la dimensión cualitativa que ha de cumplir la ley aquí.

No se trata de determinar, por ejemplo, si el presupuesto de hecho de una norma reglamentaria menor es de aplicación –de modo innominado o implícito– a la fabricación de un producto industrial, sino de algo muy distinto. *Supra* III.3 y notas 3 y 4.

la enfermedad infecciosa– ha de reunir unas garantías elementales, que aquí no concurren[227]. El *reglamento* en el *derecho ordinario* –en materias reservadas a la ley y más aún en el terreno de los derechos fundamentales– es *ejecutivo* o de *desarrollo,* no *creativo* e *innovador;* y, desde luego, no desplaza a las leyes: las *implementa* y *aplica*[228].

c) La Sentencia termina, en fin, con la admonición de que hubiera sido (solo) «deseable» (y no jurídicamente exigible) una regulación específica más detallada, en vez de «conceptos indeterminados» y «cláusulas generales»[229]. Y ello, dice, «para ofrecer la máxima seguridad jurídica»[230].

d) Por lo demás, y aunque la Sentencia se cuida de explicitar que en este procedimiento judicial cabe «todo lo más... una verificación *prima facie* de la adecuación, necesidad y proporcionalidad de las medidas dispuestas»[231], lo cierto es que el mecanismo de la «ratificación» –primero en los TSJ y ahora en el TS–, pretendido sucedáneo del déficit legislativo (y democrático)[232], ha conducido a sobredimensionar este principio (y con ello a banalizar el Estado de derecho), hasta el punto de inducir en muchos la idea de que, si es proporcionada una intervención, será por fuerza legítima. Se olvida así, primero y sobre todo, que la proporcionalidad constituye *una* pieza o garantía entre otras, y no la síntesis artificial de todas ellas[233]; segundo, que el test para determinar la desproporción *en la ley* (aún más que *en su aplicación*) solo en casos *manifiestos* puede dar positivo en sede jurisdiccional[234]; y, tercero, que por definición es un principio *relativo*, que no hace pronunciamientos absolutos sobre la injerencia en sí (ni por tanto fija criterios de una vez por todas), tanto porque mide la relación de medio a fin en cada caso y no en abstracto[235], cuanto porque remite a hechos y circunstancias: una medida hoy puede ser proporcionada, y la misma, la próxima semana, en el mismo lugar, no serlo. En este contexto, resulta difícil, por decir lo menos, el encaje de este test en el molde de un recurso de casación y, con carácter más general, en la ratificación judicial[236]. Esta Sentencia a la postre parece inscribirse en esa línea, en lugar de hacer frente a los vicios de *ultra vires* y de fortalecer los principios fundamentales y fundadores de nuestra democracia. En definitiva, margina problemas previos de trascendencia[237], no se opone a la función cuasi-normativa atribuida[238] y deja sentada una doctrina extremadamente peligrosa[239].

UNA REFLEXIÓN FINAL. LA CRISIS DE LA DEMOCRACIA PARLAMENTARIA

Habilitación y *regulación parlamentarias* de la acción sanitaria del Ejecutivo y la Administración contra la enfermedad constituyen la primera exigencia básica: no basta con la autorización legal (expresa y circunstanciada, naturalmente) de medidas restrictivas en el ámbito de los

227. I, IV.1.2 *in fine*.
228. *Ibid.*
229. Elementos estos, sin duda, no equivalentes. Los conceptos indeterminados pueden ser respetuosos con los principios constitucionales aquí referidos. Las cláusulas generales, no (*supra* nota 1, III.3).
230. STS 719/2021, f.j. 4.D. No es, sin embargo, un problema primariamente de seguridad jurídica, sino de legitimación democrática como se insiste (notas 211, 220, *infra* V). En ese sentido, la Sentencia incurre en el equívoco de equiparar la certidumbre de efectos sancionadores con la función de la ley en este ámbito. En todo caso, el principio de legalidad –y la reserva de ley– en el ámbito de los derechos fundamentales cumple una función distinta que en el terreno sancionatorio.
231. *Ibid.* f.j. 4.B. Ello lo dice, sin embargo, a los efectos de subrayar que aquí no se agotan las cuestiones de legalidad, ni las exigencias de la tutela judicial, por lo que la ratificación no cierra las puertas a ulteriores recursos. Ahora bien, el control preventivo de la ratificación versa también sobre la proporcionalidad de las medidas sanitarias (STS 788/2021, de 3 de junio, f.j. 5).
232. II, IV.1 y 2, notas 211, 220, 230, e *infra* V.
233. Una medida puede ser proporcionada y, sin embargo, suponer la lesión del contenido constitucionalmente garantizado, resultar contraria a los fines que el ordenamiento permite o incurrir en discriminación. Me remito a mi trabajo sobre «El principio de proporcionalidad. Estudio preliminar», en *Cuadernos de Derecho Público*, 5, 1998, INAP, número monográfico sobre el principio de proporcionalidad, pp. 35 y ss., y, sobre todo, 42-43.
234. Lo que se pone de manifiesto también en este caso en el propio auto recurrido, con sus votos particulares, y las alegaciones de la recurrente (f.j. 1 y 2) y en las acertadas alegaciones, a nuestro juicio, del Ministerio Fiscal (f.j. 3).
235. Lo cual presupone una nada fácil trabazón del término de comparación entre los medios restrictivos y sus fines inmediatos, vedando que cualquier medida limitadora se empareje con fines últimos y maximalistas del tipo «o se cierra el parque infantil», «se traza toda acción humana», y «se confina a toda la población» o «perecemos todos», por razones obvias, pues el miedo ha sido el más potente instrumento utilizado por el Estado autoritario. En sentido análogo, Lord Sumption, *op. cit.*, nota 1. En igual sentido, ha razonado el Tribunal Constitucional alemán, en los primeros meses desde marzo de 2020. La relación de medio a fin se inscribe en una larga escalera, en la que el fin al que propende el medio objeto de examen será a su vez medio para otro fin más alto. La proporcionalidad requiere enjuiciar el medio con su fin inmediato.
236. Ello explica, por ejemplo, que el control judicial, más propio de una apelación, se derive hacia la suficiencia de la motivación o justificación de la medida, ante la imposibilidad de una unidad de doctrina en materia de proporcionalidad, como por cierto pretendía el recurrente (*cf.* f.j. 2). En igual sentido, la STS 788/2021, de 3 de junio, concluye que las medidas enjuiciadas no son proporcionadas (f.j. 8), cuando en realidad quiere decir que no están suficientemente justificadas o motivadas, lo cual es distinto.
237. Como los señalados en nota 166.
238. Tanto por razones de fondo (nota 62), como de forma (nota 209), y en las que ahora no cabe entrar. Véase la nota 222.
239. Un precepto abierto como el examinado serviría para otorgar tan amplios poderes al Ejecutivo en el futuro para hacer frente a cualquier otra crisis, sea o no sanitaria. Véase la nota 1.

derechos fundamentales y en las materias aquí relacionadas; es necesario además establecer todos los referentes legislativos posibles –sustantivos, procedimentales, organizativos, de condiciones y límites– para enmarcar la actividad del Ejecutivo y de la Administración y permitir el control judicial y parlamentario. Es la hora del Ejecutivo, sí, pero no la hora del Ejecutivo absoluto.

La situación generada supone el mayor desconocimiento sistémico que han experimentado nuestra Constitución y los parámetros occidentales en que se sustenta. La misión del parlamento no es puramente formal, ni es solo el lugar para la investidura. La misión del principio de legalidad y de la reserva de ley no es principalmente la de dotar de seguridad jurídica, preservar la división de poderes o hacer posible el control judicial (pues el juez lo es de la legalidad y no de vagas ideas de razonabilidad). Es, por encima de todo, la de hacer realidad la *legitimación democrática* del Ejecutivo y de la Administración[240]. Y todo ello al servicio de, y en el respeto a, la persona y a su dignidad (art. 1.1 y 10.1 CE). El Ejecutivo deriva su poder del parlamento, de la cámara electa, no directamente del pueblo. Sin el parlamento no habría democracia[241]. Si las Cortes Generales no ejercen la potestad legislativa del Estado y no controlan la acción del Gobierno, abdicando de sus dos funciones esenciales, el Ejecutivo se absolutiza y la democracia se desvanece[242].

Las Cortes están obligadas a legislar y el Gobierno a explicar y defender sus actuaciones. Como el pueblo carece de todo mecanismo institucional para pedir cuentas y controlar al Ejecutivo fuera del parlamento, la inacción de este implica una grave crisis de la democracia[243].

La mayor tensión que experimenta el Estado en su conjunto, la entera sociedad y el ordenamiento jurídico se da con el ejercicio de potestades extraordinarias. En medio de esta prueba, algunas instituciones no parecen haber estado a la altura. El derecho público que creíamos sobradamente enraizado ha mostrado profundas debilidades, una fragilidad alarmante.

El incumplimiento del *deber de legislar* ha llevado a forzar artificialmente los moldes del precario ordenamiento vigente en la lucha contra una pandemia histórica, en una auténtica operación de «ortopedia jurídica». Con todo, parece haberse aceptado ese punto de partida con cierta resignación. El debate se ha quedado en ocasiones en lo más básico y previo, en la búsqueda de una *cobertura* para restringir derechos fundamentales, obviando su *regulación* misma y otros impactos de suma trascendencia y tantas cuestiones capitales conexas. En ese contexto, no han faltado construcciones jurídicas que parecen asemejarse a una subasta a la baja. Los poderes de emergencia –cuya existencia no discute un Estado de derecho– no han de atribuirse (menos aún autoatribuirse), ni ejercerse a cualquier precio.

Resulta apremiante una *ley* contra las enfermedades infecciosas *homologable* con los países de referencia[244] (y en un plano distinto una actualización legal del derecho extraordinario del art. 116.2 CE)[245], como también lo es la aprobación de procedimientos legislativos de urgencia para tiempos excepcionales, como han puesto en práctica tantos países[246], a fin de acabar con la *masiva huida* del parlamento que supone el decreto-ley en nuestro sistema (una epidemia desbordada y extendida también por las Comunidades Autónomas)[247], y cuyo déficit demo-

240. En este contexto cabe distinguir cuatro dimensiones del principio de legalidad respecto de la Administración pública: habilitación, régimen legal, legitimación democrática y control jurídico y político.La ley autoriza o *habilita a* la Administración; le atribuye responsabilidades; le asigna competencias; le da órdenes; le impone límites y prohibiciones. Es la luz roja y la luz verde.

a) Pero la luz verde no es un cheque en blanco, puesto que la ley ha de disponer además las *reglas de juego fundamentales*, el régimen sustantivo o material, organizativo y procedimental básicos.

b) La ley le da la imprescindible *cobertura democrática* –legitimación democrática– a la acción administrativa; solo así sus decisiones son reconducibles en última instancia al pueblo.

c) La ley ofrece parámetros de control del Ejecutivo y de la Administración. Solo la ley permite el *control*, tanto jurídico (jurisdiccional en última instancia) como político. Y es que la existencia de la ley permite comparar dos cosas: lo que dispone ella por sí misma y la realidad de su aplicación. Si no hay ley el control jurídico de la acción administrativa queda reducido a la Constitución y a otros referentes internacionales, y el control político en el parlamento a la praxis que se tenga por conveniente.

La omisión completa –que es de lo que aquí se trata– supone una quiebra de las cuatro dimensiones. Ahora se subraya la más elemental: la falta de legitimación democrática que supone la omisión legislativa y el consiguiente crecimiento a su costa del Ejecutivo.

241. *Vid*. Lord. Sumption, *op. cit.*, nota 1.

242. En su caso, la falta de una mayoría parlamentaria para cumplir con el deber de legislar no es razón para disolver el principio de legalidad y la reserva de ley.

243. La ley, como se ha insistido –en contra de la referida STS (*supra* IV.3)– no tiene por objeto la certeza o la seguridad jurídica, la precisión o la tipificación: la ley es la expresión de la democracia. Su objeto es expresar opciones políticas, la elección de medios, la prelación de fines, la fijación de criterios y principios, el establecimiento de controles..., del pueblo a través de sus representantes. No es, pues, una cuestión «técnica» de previsibilidad. Es mucho más que eso.

244. *Supra* núm. III (véase nota 230).

245. *Supra* núm. II.1.

246. *Supra* núm. III.

247. *Supra* núm. II.1 y notas a pie de página.
De un lado, el decreto-ley no forma parte de la cadena normativa de la declaración de alarma, ni es su vehículo de expresión. Es más, no puede entrar en materia de derechos fundamentales. De otro, el decreto-ley no sustituye a la ley que corresponda dictar a cada parlamento en su respectivo ámbito de competencias. No porque haya una emergencia sanitaria este se convierte en el instrumento apropiado sin más, máxime cuando perdura en el tiempo. No ha olvidarse, en fin, que el decreto-ley paradójicamente, en la práctica legislativa habitual, se mantiene en su vigencia aun cuando haya transcurrida la causa que lo legitimó. No sucede lo mismo con las normas extraordinarias dictadas al amparo de una declaración de alarma en nuestro caso, o de emergencia sanitaria en el derecho comparado, como se ha visto (*supra* núm. III).

crático aún pasa desapercibido[248] (bastaría compararlo con el decreto-ley italiano para comenzar a apreciarlo)[249]. Es garantía última del principio democrático subyacente una posición institucional sólida de los jueces, tanto para rechazar actos y reglamentos sin base legislativa suficiente, que no respeten las fuentes del derecho o que supongan desplazamientos competenciales, como para oponerse al ejercicio de una función cuasi-normativa. Por lo demás, el déficit democrático en la lucha contra la pandemia es solo el último –y relevante– capítulo de un largo proceso de devaluación y crisis de la democracia parlamentaria.

Esta contribución ha sido publicada previamente en *Estado de alarma y Constitución*. Asociación de Letrados del Tribunal Constitucional, Tribunal Constitucional, CEPC, Madrid, 2022, págs. 155 y ss. Agradecemos a la Asociación de Letrados del Tribunal Constitucional las facilidades dadas para su reproducción.

Que se ha perdido toda conciencia del sistema de fuentes y del sentido de cada una de sus piezas, da cuenta el número de decretos-leyes dictados desde que se inicia la pandemia (que se cuenta por centenares), tanto a nivel del Gobierno, como de los Ejecutivos autonómicos, excepcionalmente tramitados como proyecto de ley y transcurrido un largo período de tiempo.

248. El déficit democrático del decreto-ley deriva de que se trata de una norma del Ejecutivo con una simbólica participación del parlamento. Téngase en cuenta por ejemplo lo siguiente:

1. En cuanto norma urgente elaborada en el seno del Ejecutivo carece en principio de análisis, informes o estudios previos, dificultando así además la transparencia. No faltan ocasiones en las que se desconoce por completo qué órgano, partido, sindicato, entidad, grupo o colectivo lo ha promovido o se ha interesado por su aprobación. Con frecuencia, incorporan preceptos a leyes sin tramitación parlamentaria como proyecto de ley ya vigentes quedando camuflados como si formaran parte de la ley originaria.
2. En cuanto norma aprobada por el Gobierno, entra en vigor sin la intervención del parlamento, habiendo generado situaciones consolidadas cuando este se lleva al Congreso de los Diputados. Además, cuando se trata de decretos-leyes favorecedores de un colectivo, una denegación de la convalidación en un debate –a la totalidad, nótese bien– resulta de difícil ejecución. En ocasiones, se ha llegado a conseguir la convalidación con el apoyo de algunos grupos con la promesa de que se tramitará luego como proyecto de ley, sin hacerse luego realidad en la legislatura.
3. El decreto-ley sustituye en la praxis a la ley y al parlamento, que pierde todo protagonismo: no hay obligación de tramitar por ley el decreto-ley y la convalidación de este resulta ser un acto insuficiente, habida cuenta de que el debate se hace a la totalidad, sin matices. Se adopta adicionalmente con alguna frecuencia la estrategia antiparlamentaria de incluir en el mismo decreto-ley temas heterogéneos, a fin de asegurarse su convalidación (a cada grupo que lo apoye le puede interesar solo un tema, pero habrán de apoyarlo en su conjunto porque no son desglosables).
4. El «debate» del decreto-ley se limita, en el caso de las Cortes, al Congreso de los Diputados, dejando fuera de juego al Senado.
5. El decreto-ley no pierde toda eficacia desde el principio por el hecho de que no sea convalidado, ni por el hecho de que la tramitación como proyecto de ley se haga años más tarde. Etc.

249. Sobre el decreto-ley italiano véase *supra* III.3 y notas a pie de página. Las diferencias son evidentes. En nuestro caso, el Gobierno no tiene que presentar el decreto-ley el mismo día para su convalidación en las cámaras, ni hay obligación de tramitarlo como proyecto de ley, ni existe el deber de debatir artículo por artículo para su convalidación, ni hay previsión alguna de que sea tramitado como proyecto de ley en el plazo de sesenta días perdiendo todo efecto desde el principio en caso contrario.

Nuestro Tribunal Constitucional, a nuestro juicio con un evidente desenfoque, ha podido pensar que su tarea se limita a indagar si concurre o no una causa de extraordinaria y urgente necesidad, siendo ésta una cuestión eminentemente política en la que ha de dejar un abierto margen de apreciación. Olvida, sin embargo, que su primera función es sentar criterios de delimitación negativa –lo que por definición en ningún caso puede constituir causa de extraordinaria y urgente necesidad–. Y ha tenido ya muchas ocasiones para hacerlo. Así, por ejemplo, no se puede aceptar que concurra una causa de extraordinaria y urgente necesidad en casos como los siguientes:

1. *Cuando el Gobierno carece de mayoría parlamentaria*: la falta de mayoría no equivale a extraordinaria y urgente necesidad.
2. *Cuando no se ha transpuesto en plazo* (siempre muy generoso) *una Directiva de la Unión Europea*: la sanción que pueda aparejar el incumplimiento no es causa de extraordinaria y urgente necesidad.
3. *Cuando la tramitación de un asunto como proyecto de ley resulta discutido y polémico*: sustraerse del debate o huir de la falta de consenso no es una causa de extraordinaria y urgente necesidad.
4. *Cuando hay prisas* (¿cuándo no las hay?): las prisas podrán justificar una tramitación de urgencia de un proyecto de ley (a su vez con las garantías precisas para evitar la huida del debido debate).
5. Cuando en lugar de aprobar *medidas* puntuales –en consonancia con la urgente y extraordinaria necesidad– se aprueba el régimen jurídico legal de un sector o de un entero ámbito del ordenamiento.

De otra forma, el parlamento dejaría de funcionar a falta de incentivo para formar las mayorías necesarias, aprobar a tiempo la transposición de la legislación europea, mejorar los procesos legislativos e intensificar el calendario de sesiones, buscar el consenso, entre otras cosas. En consonancia con lo señalado, y sin necesidad tampoco de entrar en el corazón o fondo del asunto –esto es, si concurre o no una causa de extraordinaria y urgente necesidad– el Tribunal Constitucional podrá utilizar indicios claros del uso abusivo de esta figura que empequeñece al parlamento en casos como los siguientes:

— El decreto-ley se dicta cuando no existe mayoría parlamentaria suficiente para aprobar una ley, cualesquiera que sean las razones (pérdida de la mayoría, moción de censura, etc.).
— El decreto-ley se dicta frente a unas cámaras rebeldes, que no logran acuerdo.
— El decreto-ley se dicta cuando se han disuelto las cámaras o se van a disolver.
— El decreto-ley no consiste en medidas urgentes, sino en un nuevo régimen jurídico de cualquier tema, institución o política sectorial. Y más claro aún cuando el Decreto-ley acomete una reforma relevante de un sector.
— El decreto-ley introduce cuestiones que no se aprobarían por ley, para lo que regula varios temas al mismo tiempo, con un distinto nivel de urgente necesidad.
— El decreto-ley se anuncia con semanas de antelación, en lugar de tramitarlo como proyecto de ley.

Capítulo XIV

Una historia de éxito. Experiencia de la lucha contra la COVID-19 desde la industria farmacéutica

Francisco Javier Fernández
Director general del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid

La historia de la lucha contra la pandemia por coronavirus declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo de 2020 es, desde la perspectiva de la respuesta de la industria farmacéutica, una historia de éxito.

Por supuesto, ha sido también una historia de dolor, de muerte y de desconcierto, por el sufrimiento generado por la COVID-19, por los millones de fallecidos y pacientes que aún padecen secuelas y por la desorientación y angustia que ha generado en los dos últimos años el enfrentamiento con un desafío sin precedentes en la sociedad del último siglo.

Con todo, y aunque quizá falta tiempo aún para un análisis más completo, la perspectiva de dos años permite una mirada en positivo. El éxito lo ha sido por la rapidez con la que la ciencia ha sido capaz de desarrollar soluciones, en forma de vacunas contra el virus, y también por la constatación del valor de la investigación biomédica en las últimas décadas, sustentada cada vez más en el liderazgo de las compañías farmacéuticas, en la protección de la propiedad industrial y en la colaboración entre estas, la comunidad científica y los sistemas sanitarios. Es difícil pensar que sin el conocimiento acumulado en décadas de inversión sostenida y la flexibilidad del modelo global de investigación en medicamentos se hubieran podido desarrollar vacunas seguras y eficaces en menos de un año.

Junto a ello, la experiencia de lucha contra la pandemia ha puesto de manifiesto hasta qué punto salud, economía y bienestar están ligados. Y lo ha hecho para el conjunto de la sociedad, no solo para los propios agentes sanitarios. Cada ciudadano ha experimentado en mayor o menor medida cómo una crisis sanitaria ha devenido en crisis económica y cómo el bienestar en su más abierta acepción, es decir, el hacer una vida normal de acuerdo con los cánones vigentes (visitar a familiares y amigos, disfrutar de espectáculos o viajar), se ha visto comprometido.

Todo esto ha mostrado que la investigación en nuevos medicamentos y la configuración de un sistema sanitario sólido han de estar entre las bases de toda sociedad moderna, y que no es tanto un gasto cuanto una inversión con retornos palpables desde una triple perspectiva sanitaria, económica y social. Es posible que esto marque un antes y un después en la percepción social y contribuya a avanzar aún con mayor determinación en la apuesta por la ciencia biomédica y los sistemas de salud.

Queda mucho por hacer. No todo se ha hecho a la perfección a la primera, como es natural. Pero el esfuerzo realizado por la industria farmacéutica desde el inicio de la pandemia no solo ha sido crítico para afrontar este reto gigantesco, sino que –y es el objetivo de este capítulo– ha generado una serie de aprendizajes que permitirán encarar con mayor preparación futuras crisis sanitarias globales.

1. ¿La carrera investigadora más grande de la historia de la medicina?

El 4 de febrero de 2020, una semana antes de que la Organización Mundial de la Salud (OMS) anunciara que la enfermedad causada por un nuevo coronavirus descubierto oficialmente en China en diciembre de 2019 se denominaría COVID-19, la industria farmacéutica mundial se había empezado a movilizar. La Federación Europea, Efpia, ya había activado a todas sus compañías asociadas

para que identificaran qué tratamientos ya utilizados o en investigación podrían ser eficaces para frenar el brote de este virus y poner todos estos datos en común (1). Apenas un mes después de este llamamiento, estos grupos de trabajo colaborativos tenían ya en pruebas una treintena de medicamentos antivirales para ver su eficacia contra la COVID-19, y cuatro compañías farmacéuticas habían comenzado ya sus investigaciones con una posible vacuna.

Fue el inicio de lo que muchos han denominado la mayor carrera investigadora en la historia de la medicina, gracias a la movilización de compañías farmacéuticas de todo el mundo que han trabajado desde entonces y lo siguen haciendo en colaboración con centros públicos de investigación y con agencias reguladoras. En apenas siete meses ya se estaban investigando en todo el mundo más de 300 potenciales medicamentos frente a la COVID-19 (2). Estos iban desde antipalúdicos y antivirales hasta medicamentos antiinflamatorios y tratamientos a base de plasma. De ellos, el 60 % eran tratamientos reutilizados y un 40 % tratamientos novedosos. Según los datos de la Federación Internacional de la Industria del Medicamento (Ifpma), al menos había en aquel momento 25 compañías farmacéuticas inmersas en esas investigaciones.

Fueron las vacunas las que se abrieron camino con mayor rapidez. El 8 de diciembre de 2020, menos de nueve meses después de que la OMS declarara oficialmente la pandemia el 11 de marzo, una mujer británica recibía la primera vacuna. Fue un hito histórico. El tiempo medio para el desarrollo de un medicamento es de unos diez años. En las siguientes semanas y meses llegarían otras, y la batalla contra la pandemia comenzaría a ganarse.

Unos 700 potenciales medicamentos y vacunas contra la COVID-19 se han investigado a lo largo de estos dos años de crisis. En abril de 2022, al redactar estas líneas, hay diez vacunas contra la COVID-19 aprobadas en todo el mundo, cinco de ellas de uso en Europa al contar con el visto bueno de la Agencia Europea del Medicamento. Y las investigaciones sobre nuevas vacunas continúan: hay otras 153 en ensayos clínicos, de las que 36 están ya en la última fase de investigación. Se suman a este arsenal otros ocho medicamentos ya autorizados en la UE, y, según los registros de la OMS, se están llevando a cabo más de 1.600 ensayos clínicos con posibles tratamientos en todo el mundo (4).

2. LA COLABORACIÓN PÚBLICO-PRIVADA: REALIDAD Y FUTURO

Un eje fundamental de la carrera investigadora contra la COVID-19 ha sido la colaboración entre industria farmacéutica, gobiernos, agencias reguladoras y comunidad científica. La investigación de nuevos medicamentos es desde hace tiempo, y cada vez más, un proceso abierto, multinacional y colaborativo. La investigación básica no se hace solo en el seno de grandes compañías farmacéuticas; también en universidades, hospitales y otros centros de investigación y empresas grandes y pequeños, públicos y privados. El desarrollo digital y de las tecnologías de la información contribuye a la generación de conocimiento básico y también a su divulgación. El reto cada vez mayor es convertir ese conocimiento básico en tratamientos eficaces y seguros, es decir, conducirlo por las complejas y costosas fases preclínica y clínica. En ellas están los grandes costes, por las crecientes exigencias de las agencias reguladoras y por la alta tasa de fracaso: menos de un 10 % de los medicamentos en desarrollo que alcanzan la fase clínica llegan hoy a convertirse en medicamentos disponibles (ver figura 1).

La experiencia, la capacidad de gestión y coordinación y el músculo financiero de la industria farmacéutica son críticos para asumir estos desarrollos. Hoy, se estima que el desarrollo medio de un nuevo medicamento implica una inversión superior a los 2.500 millones de euros, y más del 60 % de ese coste corresponde al desarrollo clínico. El desafío, por lo tanto, está en detectar el conocimiento biomédico básico allá donde se genere y fomentar acuerdos de cooperación que otorguen a ese conocimiento prometedor una posibilidad de desarrollo que de otro modo no tendría, puesto que ninguna universidad, ningún hospital, ningún otro centro investigador o pequeña empresa podrían asumir los riesgos y costes que implica.

El camino está trazado. Junto a las iniciativas particulares, grandes programas llevan años allanando el terreno para la colaboración público-privada en investigación biomédica. Así, con más de una década de vida, el programa IMI (Iniciativa de Medicamentos Innovadores) es el proyecto de colaboración público-privada más grande del mundo en salud. Está financiado al 50 % entre la Comisión Europea y la industria farmacéutica a través de la federación europea, Efpia, y en algo más de diez años ha hecho posibles inversiones por más de 5.300 millones de euros e impulsado 107 proyectos público-privados para el fomento de la I+D de medicamentos innovadores en la región. En el caso de la última epidemia de ébola, esta iniciativa consiguió descubrir y poner a disposición de las autoridades dos vacunas y cuatro test de diagnóstico. Ante la COVID-19, como se ha explicado, varias compañías farmacéuticas iniciaron ya desde febrero de 2020 una colaboración con centros públicos para acelerar la consecución de tratamientos.

La colaboración no se queda únicamente en el terreno de la investigación. Otra constatación de la experiencia de la pandemia es la importancia crítica de la cooperación entre compañías farmacéuticas y agencias

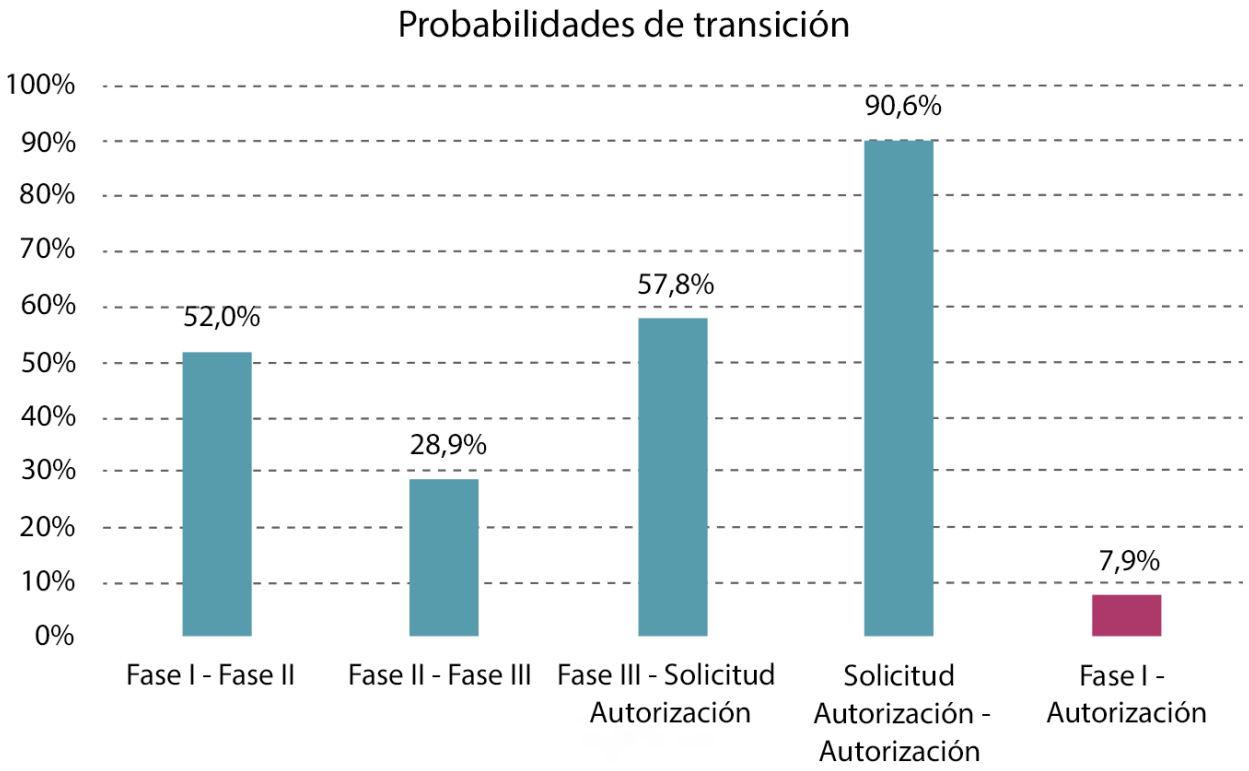


Figura 1. Tasas de éxito y factores contribuyentes 2011-2020. Fuente: BIO, QLS Advisors, Informa UK Ltd. 2021, Clinical development. «Success rates and contributing factors 2011-2020». Disponible en: https://pharmaintelligence.informa.com/~/media/informa-shop-window/pharma/2021/files/reports/2021-clinical-development-success-rates-2011-2020-v17.pdf

reguladoras. En un entorno de emergencia en el desarrollo de vacunas contra el coronavirus, el trabajo estrecho entre las compañías desarrolladoras y las grandes agencias ha permitido revisiones continuadas y en paralelo de las garantías de seguridad, eficacia y calidad que han permitido acelerar notablemente los plazos. Esta revisión continua (*rolling review*) sometida a la mayor prueba de esfuerzo posible durante la crisis ha mostrado sus resultados. Las vacunas han pasado todos los controles que de forma ordinaria afronta cada nuevo medicamento, pero lo han hecho en tiempo récord. Las garantías para las personas que utilizan unas y otros son idénticas, pero la disponibilidad nada tiene que ver: varias vacunas aprobadas en apenas un año frente a una media temporal de desarrollo de un medicamento de diez años en la que la evaluación por parte de las agencias es una parte relevante.

Esta experiencia debe marcar el futuro próximo. Desde luego, y como se ha explicado desde la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (Aemps), ese *rolling review* exige un extraordinario esfuerzo de recursos por parte de las agencias, que tendrían que verse reforzadas. Pero la realidad es que la experiencia de la pandemia constata que cabe ganar tiempo en el proceso de evaluación de los medicamentos por las autoridades reguladoras, lo que implica un acceso más temprano de los pacientes a la innovación.

3. EL DESAFÍO DE LA PRODUCCIÓN

Casi al nivel de complejidad y exigencia de la investigación contra el reloj de vacunas contra la COVID-19 estuvo desde el primer momento el desafío de la producción a una escala y en un tiempo sin precedentes. Una vez que se lograra una vacuna segura y eficaz, y dado que en los proyectos en marcha se adelantaba que serían necesarias dos dosis, habría que producir con rapidez del orden de 10.000 millones de dosis, las necesarias para vacunar a ese 70 % de la población mundial que, en aquellos primeros meses de la pandemia, se consideraba mínimo para lograr la denominada inmunidad de grupo.

Esto era un reto grandioso, puesto que el mercado de las vacunas antes de la pandemia era limitado, en él operaban apenas una docena de compañías en todo el mundo y la capacidad mundial de producción antes de la pandemia estaba por debajo de los 5.000 millones de dosis al año. Habría que triplicar al menos esa capacidad, para asegurar la fabricación de las restantes vacunas y atender la urgente necesidad de la vacuna o vacunas que llegaran contra la COVID-19. Y hacerlo en muy poco tiempo.

Las compañías desarrolladoras comenzaron a trabajar en tres líneas principales. En algunos casos decidieron empezar a producir a riesgo, es decir, antes de la

aprobación de su vacuna, con el fin de que, en el caso de que finalmente obtuviera *luz verde*, estaría en condiciones de iniciar la distribución de dosis de forma inmediata. Por otro lado, abordaron inversiones para ampliar sus propias plantas de producción, anticipando el incremento de demanda. Y una tercera línea fue buscar compañías en diferentes partes del mundo con capacidad para producir vacunas o al menos participar en alguna parte del proceso de producción y sellar acuerdos con ellas.

El camino no ha sido fácil. Las vacunas son productos biológicos de alta complejidad, y en algunos casos, además, se trataba de vacunas con tecnologías completamente nuevas, con condiciones de producción y conservación muy especiales, no experimentadas antes a nivel industrial. Por eso, para aumentar la capacidad garantizando la seguridad y la calidad, las compañías recurrieron a acuerdos de licencia voluntaria, que permitían la transferencia de conocimiento, experiencia y tecnología entre el desarrollador de la vacuna y la compañía especializada en la fabricación.

Estos acuerdos han sido críticos para conseguir los objetivos. En poco más de un año, es decir, a marzo de 2022, la producción de vacunas frente a la COVID-19 había superado los 12.100 millones de dosis, suficientes para vacunar a toda la población adulta mundial, según los datos de la consultora independiente Airfinity, con 83 plantas de producción situadas en 70 países de todo el mundo participando en la fabricación. El ritmo mensual de producción de vacunas se ha cuadruplicado desde el inicio de la fabricación. La producción comenzó siendo cercana a los 350 millones de dosis al mes y en marzo de 2022 se producían cerca de 1.400 millones de dosis todos los meses (3).

En la base de este logro, como se ha mencionado, están los 370 acuerdos de colaboración entre compañías desarrolladoras y productoras, muchas de ellas competidoras entre sí, por todo el mundo. Casi el 90 % de estos acuerdos incluyen diversas formas de colaboración voluntaria que se basan en la transferencia de tecnología y el intercambio de conocimientos sobre los procesos y las tecnologías utilizadas para fabricar las vacunas, así como la formación de personal especializado para garantizar los estándares de calidad.

La relevancia de la colaboración no solo radica en la multiplicación de la capacidad de producción global, que, como se ha indicado, se ha triplicado solo para las vacunas contra la COVID-19 en apenas un año, sino en las garantías de calidad y seguridad. El proceso de fabricación de vacunas es muy complejo y requiere conocimientos específicos, tecnología puntera, instalaciones adecuadas, equipos humanos preparados y una experiencia que solo está al alcance de unas pocas compañías en todo el mundo. Estos acuerdos de transferencia han hecho posible que muchas compañías por todo el globo hayan podido sumarse a la producción con las mismas garantías de calidad y seguridad.

La disponibilidad de vacunas, sin embargo, no ha implicado hasta el momento un acceso equitativo. Según los datos que publican tanto Unicef como la Universidad de Oxford en la plataforma *Our World in Data*, hasta marzo de 2022 se habían administrado un total de 10.930 millones de dosis en todo el mundo. Esto supone que el 63,4 % de la población mundial había recibido al menos una dosis de una vacuna contra la COVID-19, si bien solo el 13,7 % de las personas que viven en países en desarrollo habían recibido al menos una dosis de la vacuna.

Tenemos vacunas suficientes, pero no somos capaces de hacerlas llegar a todo el mundo. Es quizá el gran desafío que permanece abierto y que deberá tener respuesta tanto para asegurar la vacunación contra la COVID-19 en todo el mundo cuanto para afrontar futuras crisis sanitarias globales.

Los compromisos de los países desarrollados de compartir sus excedentes (hay que recordar que compraron vacunas cuando aún no estaban aprobadas, por lo que las aprobaciones posteriores les permitieron en muchos casos recibir más dosis de las necesarias) y la articulación, por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de mecanismos como Covax, para la adquisición y distribución de vacunas en países menos desarrollados, entre otras medidas, parecen haber chocado con la realidad de los problemas logísticos y la falta de estructuras sanitarias sólidas en muchos países. El principal reto para la vacunación en África, como han reconocido los Centros Africanos para el Control de Enfermedades, ya no es la escasez de vacunas, sino los problemas logísticos y la información errónea de la población sobre la utilidad de dichas vacunas. Reforzar el apoyo a los sistemas de salud de los países con menos recursos para que puedan llevar a cabo los planes de vacunación entre la población se antoja una necesidad para afrontar retos globales en salud.

4. EL PAPEL CRÍTICO DE LAS PATENTES

La protección industrial ha jugado un papel crucial tanto en la carrera por el desarrollo de medicamentos y vacunas contra la COVID-19 como en el no menos complejo desafío de multiplicar la producción. Ya se ha dicho que el logro sin precedentes de obtener vacunas en menos de un año no hubiera sido posible sin el modelo vigente de investigación biomédica global, cada vez más abierto, colaborativo e internacional, sustentado en el liderazgo de la industria farmacéutica, la protección industrial y la cooperación público-privada. Este modelo ha fomentado una inversión en investigación biomédica sostenida en el

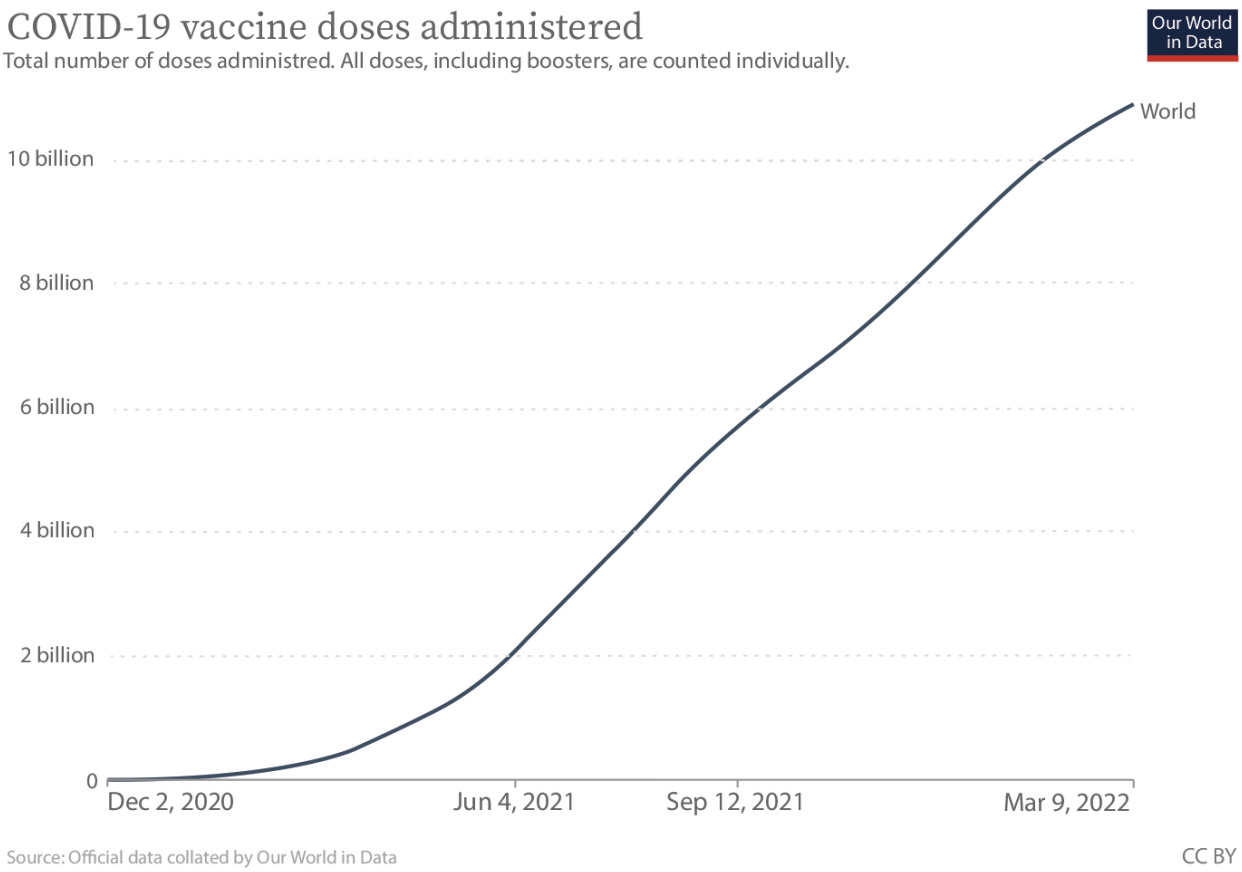


Figura 2. Dosis de vacunas de COVID-19 administradas

tiempo a lo largo de décadas que ha revolucionado la lucha contra la enfermedad en los últimos tiempos a través de la medicina de precisión y las terapias avanzadas. Sobre esa base de conocimiento y de capacidad organizativa e inversora se ha logrado el hito histórico de administrar una vacuna eficaz y segura menos de nueve meses después de declararse oficialmente una pandemia.

La propiedad industrial a través de las patentes ha sido igualmente esencial para la multiplicación de la capacidad productiva, dado que genera un marco de protección y confianza a las compañías desarrolladoras para transferir conocimiento y tecnología a otras empresas.

No han faltado voces, sin embargo, que han solicitado la suspensión de las patentes de las vacunas contra la COVID-19 como medida para acelerar la producción de dosis y cubrir así con mayor rapidez y equidad la demanda mundial.

La industria farmacéutica se pronunció en contra desde el primer momento. No solo no veía en esas suspensiones la solución al acceso de todos los países a las vacunas de forma rápida y equitativa, sino entendía que podrían generar graves efectos no deseados.

Hay que tener en cuenta, se explicó por parte de los representantes internacionales de la industria farmacéutica, que el proceso de fabricación de vacunas es muy complejo y requiere –como ya se ha explicado– unos conocimientos específicos, una tecnología puntera, unas instalaciones adecuadas, equipos humanos preparados y una experiencia que, en la actualidad, solo está al alcance de unas pocas compañías en todo el mundo. Por supuesto, muchas otras empresas podían colaborar en algunas fases del proceso de fabricación, pero, aun así, requerían de una transferencia de conocimiento y tecnología del desarrollador.

La industria optó por los acuerdos de colaboración entre compañías por todo el mundo, siempre dentro de ese marco de protección industrial. Más de 370 acuerdos han hecho que más de 80 compañías en 70 países (entre ellos India, China, Brasil, Sudáfrica, Egipto o Indonesia) se hayan involucrado en una carrera productora que superó en marzo de 2022 los 12.100 millones de dosis disponibles y ha hecho que la disponibilidad de vacunas ya no sea el problema para la inmunización en países menos desarrollados.

El debate sobre las patentes de los medicamentos, reavivado con motivo de la pandemia, no puede obviar el hecho clave de que la protección industrial ha sido crítica para llegar hasta hoy en materia de lucha contra la enfermedad y lo es para garantizar que en el próximo futuro dispongamos de nuevos medicamentos. Los derechos de

propiedad son cruciales para que compañías farmacéuticas en todo el mundo se lancen a la larga, costosa e incierta carrera de investigar medicamentos. El alto riesgo es quizá el rasgo más diferenciador entre la I+D en la industria farmacéutica y en otros sectores: no solo es una carrera de obstáculos, sino que la tasa de fracaso es incomparable, como se ha visto más arriba, por la complejidad y multitud de variables que afronta el desarrollo de un medicamento.

Tampoco se debe olvidar que las patentes contribuyen al conocimiento científico, dado que cuando una compañía halla un potencial desarrollo y lo patenta hace público para toda la comunidad científica el conocimiento que le ha llevado hasta allí, de modo que ésta puede sumar ese conocimiento a su labor investigadora y acelerar así la consecución de nuevos hallazgos.

Son, hay que insistir, la piedra angular de un modelo de I+D biomédica mundial que permite que las compañías farmacéuticas desarrollen el 95 % de los medicamentos hoy disponibles, que en las últimas décadas se hayan logrado asombrosas mejoras en la lucha contra la enfermedad y que, en definitiva, tras la caducidad de la protección industrial y la llegada de genéricos y biosimilares, se promueva la competencia y se logren ahorros que se pueden reinvertir en seguir fomentando la innovación.

5. ESPAÑA: UN PROTAGONISMO ESCLARECEDOR

La pandemia también ha supuesto un reto exigente para la industria farmacéutica asentada en España. Desde el inicio de la crisis, las compañías farmacéuticas tuvieron que encarar cuatro grandes frentes principales: garantizar el suministro tanto de los medicamentos que se han utilizado contra el coronavirus en los hospitales como de los que necesitaban cada día los millones de ciudadanos para controlar sus enfermedades; contribuir con sus equipos científicos y su experiencia a la tarea global de investigación, en especial en ensayos clínicos, donde España es un referencia internacional; normalizar la actividad en los ensayos clínicos en marcha con otras patologías, y ayudar a los servicios de salud, hospitales y demás organizaciones que trabajaban sobre el terreno para contener la infección y tratar a los pacientes.

El primer reto, complicado aún más con el comienzo del estado de alarma decretado por el Gobierno el 14 de marzo, fue garantizar el suministro de medicamentos, al ser considerado uno de los servicios esenciales para el país. España cuenta con 160 plantas de producción farmacéutica, de las que 82 se dedican exclusivamente a la fabricación de medicamentos de uso humano. Todas estas plantas de producción de medicamentos de uso humano siguieron funcionando a pleno rendimiento. Se aplicaron planes de contingencia que no solo lograron mantener la producción, sino que en muchos casos llegaron a duplicarla o triplicarla para atender el repentino incremento de demanda de productos considerados críticos o esenciales en las UCI de los hospitales.

El *stock* de seguridad previsto por las compañías fue otra de las claves para que en el período más comprometido de la crisis no hubiera problemas serios de desabastecimiento de medicamentos (5). En este objetivo de garantizar la continuidad de los suministros fue clave también tener un contacto continuo y directo con la Aemps, con el fin de detectar cualquier alteración en materia de suministro de fármacos y articular las medidas oportunas para garantizar la atención a los pacientes.

La interlocución entre compañías y el resto de agentes de la cadena del medicamento, como distribuidores y farmacias, además de la Aemps, ayudó a anticipar los riesgos y aplicar soluciones. Y esta interlocución dentro de las fronteras de España se dio también hacia afuera, para conocer en todo momento el estado de los suministros en el ámbito internacional y asegurar la llegada al país tanto de materias primas como de productos terminados.

En el ámbito de la investigación, España es un país de referencia en el mundo en la realización de ensayos clínicos para probar la eficacia de los nuevos medicamentos, y la carrera investigadora para hallar medicamentos y vacunas contra la COVID-19 ha reafirmado ese liderazgo.

A lo largo de la última década, España ha ido ganando terreno en una materia, la investigación clínica, que implica la colaboración estrecha entre la Administración sanitaria, la Aemps, los hospitales, los pacientes y las compañías farmacéuticas. El aliento de la Administración, que con el Real Decreto de Ensayos Clínicos que entró en vigor a comienzos de 2016 se anticipó a la regulación europea; la implicación positiva de la Aemps; la solidez del sistema sanitario y la alta cualificación de sus profesionales; la creciente participación de los pacientes, con el relevante papel desempeñado en este sentido por las organizaciones que los representan, y la fuerte apuesta de las compañías farmacéuticas han impulsado la relevancia de España en este ámbito, hasta el punto de que centros españoles participan en tres de cada diez ensayos que se hacen en Europa. Para muchas grandes compañías farmacéuticas España es ya el segundo país del mundo en investigación clínica, tras Estados Unidos.

La prueba de esfuerzo que supuso la pandemia ha mostrado la solidez y capacidad de reacción del modelo español. En febrero de 2021 se contabilizaban 160 ensayos clínicos con medicamentos frente al coronavirus en desarrollo en hospitales españoles, con una veintena de compañías farmacéuticas involucradas, 216 hospitales y una previsión de participación de 28.000 pacientes. España se situaba, con los datos de la OMS, como primer país de

Europa y cuarto del mundo en ensayos clínicos contra la COVID-19, posiciones que mantendría en adelante.

Esta capacidad de respuesta se hubo de conciliar con otro desafío crítico, especialmente en los momentos más duros de la crisis: tratar de que ésta afectara lo menos posible a los ensayos clínicos en otras enfermedades que se realizaban en los hospitales españoles. Había que intentar mantener la actividad sin poner en riesgo principalmente la seguridad de los pacientes, pero también la de los monitores y otros profesionales implicados en el proceso. La situación generada por la pandemia, con hospitales colapsados y con medidas de confinamiento con el objetivo de frenar los contagios, sometió a una fuerte tensión a la actividad investigadora, dada la necesidad de orientar la mayor parte de los recursos en los centros a atender la urgencia de la crisis y las dificultades añadidas como, por ejemplo, el mayor riesgo de contagio para los pacientes participantes en los ensayos en sus visitas al hospital. Todo esto impidió, entre otras actividades, las visitas de seguimiento de los pacientes, la recogida de la medicación o la monitorización de los resultados *in situ*.

Hubo que pausar algunos ensayos en marcha, pero la rápida reacción de la Aemps –que publicó a mediados de marzo de 2020 un documento, luego actualizado, con medidas excepcionales para gestionar los problemas derivados de la emergencia sanitaria en materia de ensayos clínicos– y de las compañías promotoras, en coordinación con investigadores y centros, permitió que en todo este tiempo los pacientes no se quedaran sin su medicamento, en algunos casos su única esperanza para la supervivencia. No solo se normalizó con rapidez la situación, sino que España cerraría 2020 con un récord de ensayos puestos en marcha, superando el millar (6).

Una clave, más allá de la demostrada resistencia del modelo de ensayos en España, fue la aplicación de la tecnología. La realización de reuniones telemáticas, el uso de la telemedicina o la monitorización en remoto, en combinación con la distribución de la medicación en el domicilio del paciente, demostraron que se puede mantener la realización de estos estudios con garantías y seguridad, e incluso con mayor eficiencia.

Estas soluciones no solo permitieron normalizar con agilidad la situación, sino que aportaron un conocimiento valioso para el futuro. De hecho, desde las compañías farmacéuticas se están haciendo ya propuestas para combinar el modelo tradicional de desarrollo de ensayos clínicos con formatos virtuales o con la digitalización de determinados procesos (7).

El cuarto gran desafío para las compañías farmacéuticas que operan en España fue el apoyo a los servicios de salud, hospitales y otras organizaciones sanitarias y sociales ante las necesidades sobrevenidas con la crisis. La industria reaccionó con agilidad, y sus iniciativas de apoyo incluyeron desde donaciones de medicamentos y de material sanitario y de protección hasta ayudas económicas directas, tanto a las autoridades sanitarias como a instituciones locales y regionales por toda España, o la adaptación de líneas productivas para fabricar y donar geles desinfectantes, equipos de protección y nuevos respiradores.

Una de las primeras necesidades planteadas por la crisis fueron los materiales sanitarios. Para ello, y según recogió Farmaindustria tras un sondeo entre sus compañías asociadas, algunas de las plantas de producción adaptaron sus lineales para producir grandes cantidades de gel hidroalcohólico desinfectante y entregarlo a las autoridades sanitarias, y otros laboratorios colaboraron en la puesta a disposición del Ministerio de Sanidad tanto de test de diagnóstico de coronavirus como de respiradores para las Unidades de Cuidados Intensivos de los hospitales. También hubo compañías que movilizaron al personal de sus plantas de producción para colaborar en el desarrollo de prototipos de respiradores destinados a los enfermos graves, y otras utilizaron sus impresoras 3D para la fabricación urgente de equipos de protección individual (EPI). Así, hubo compañías colaborando en el desarrollo y producción de bifurcadores impresos 3D que permitieron dar accesibilidad a más de un paciente afectado por el coronavirus, con un único respirador.

Las plantas de producción tuvieron que adaptarse y reconvertirse en muchos casos para poder ayudar durante la pandemia. En algunos casos, las fábricas aumentaron hasta un 10% sus operarios durante la crisis para mantener el suministro. Además, muchas de las fábricas realizaron durante este tiempo paradas de producción programadas para asegurar la desinfección de las plantas y reducir el riesgo de contagios, manteniendo siempre activa la distribución para no afectar a la cadena de suministro. Esta labor ha implementado de forma masiva nuevas herramientas tecnológicas en remoto, realizando una fuerte actividad de formación entre todos los empleados e interaccionando con los equipos de producción y distribución que realizan su actividad presencialmente en las plantas de producción.

Otras compañías farmacéuticas ofrecieron su ayuda de la mano de las sociedades científicas, como la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH) o la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI), a través de las cuales se realizaron donaciones a centros sanitarios de toda de España de medicamentos analgésicos, antibióticos, insulinas o sales de rehidratación y productos sanitarios como pulsioxímetros y termómetros. También se donaron productos dermatológicos para que los profesionales pudieran tratarse la piel y prevenir o combatir la dermatitis que provoca el uso continuado de desinfectantes, mascarillas, guantes y gafas protectoras.

Igualmente, numerosos laboratorios colaboraron a través de las sociedades médicas con los servicios de Farmacia de la red de hospitales para poder realizar envíos de medicación a los domicilios de los pacientes y evitar así los desplazamientos al hospital, previniendo posibles contagios. Además, las compañías cuyos medicamentos estaban en ensayos para comprobar su eficacia frente al coronavirus donaron las dosis necesarias tanto para su investigación como para su posterior utilización en pacientes.

Otras compañías realizaron distintas donaciones a instituciones como Cáritas, Save the Children, Médicos sin Fronteras, Aldeas Infantiles, Cruz Roja, Unicef, Banco Farmacéutico, el Banco de Alimentos o Mensajeros de la Paz, con especial atención en las entregas a centros de mayores de miles de productos de aseo personal, como geles y champús, así como de higiene femenina, con destino a hospitales, residencias y todo tipo de centros sanitarios y de acogida.

En esta labor de ayuda y colaboración, las compañías farmacéuticas pusieron también a disposición de las asociaciones de pacientes una serie de cursos *on line* de formación sobre el impacto de la pandemia en sus respectivas patologías. Se organizaron también sesiones de formación para profesionales sanitarios sobre las características del virus y la posible incidencia en sus áreas de trabajo.

Además de estas donaciones, trabajadores de las compañías asociadas a Farmaindustria se sumaron a los cientos de médicos, enfermeras, farmacéuticos y otros licenciados en Ciencias de la Salud, además de profesionales de otros ámbitos, que se ofrecieron para colaborar en alguno de los centros sanitarios o en cualesquiera de los otros dispositivos y acciones que se movilizaron para atender a las personas infectadas por el SARS-CoV-2.

6. UNA EXPERIENCIA QUE DEBE AYUDAR PARA EL FUTURO

Tan dura experiencia, tanto dolor, tanto esfuerzo para hacer frente a una crisis tan profunda han de servir para estar mejor preparados ante desafíos futuros. Según vienen advirtiendo científicos y clínicos, tales desafíos llegarán, con lo que se hace aún más importante extraer positivos aprendizajes de estos dos años de pandemia.

Un primer aprendizaje en el ámbito global está la estrecha relación entre salud y economía y bienestar en el más amplio sentido. Una crisis sanitaria ha devenido en profunda crisis económica y ha cuestionado aspectos tan básicos del bienestar social como la libertad de movimiento o el disfrute del ocio en comunidad. Del mismo modo, la salud se vincula a la disposición de un sistema sanitario sólido, a los medicamentos y a la investigación que los hace posibles. Solo la llegada de las vacunas permitió realmente empezar a superar la pandemia.

Esto debería mover también a la reflexión sobre la condición de los fondos destinados a la salud, entre ellos los dedicados a la adquisición de medicamentos. Tiende a hablarse de ellos únicamente como un gasto, cuando la experiencia de la COVID-19 ha mostrado hasta qué punto son una inversión que no solo contribuye a proteger la salud, y por tanto la esperanza y la calidad de vida, sino que impulsa el desarrollo económico y social. La evidencia científica publicada lo demuestra. Estima que un aumento de un año en la esperanza de vida en un país contribuye a aumentar su PIB un 4 % (8). La pandemia ha mostrado esto al conjunto de la población, que lo ha experimentado, lamentablemente, en carne propia.

Esta toma de conciencia ha de ser relevante para estudiar las estrategias futuras en materia de salud y, desde el diálogo abierto con la población, mucho más concernida, plantear las necesidades financieras y el esfuerzo que la sociedad está dispuesta a hacer en el sistema de salud.

Hemos comprobado, por otro lado, el sentido, la resistencia y la capacidad de respuesta del modelo global de investigación biomédica levantado sobre la base del liderazgo de la industria farmacéutica, la protección de la propiedad industrial y la colaboración público-privada. En él se sustentan los grandes avances en medicina de precisión, que han incrementado sobremanera la supervivencia en muchos tipos de cáncer, han cambiado el pronóstico de enfermedades tan graves como las reumatológicas o la esclerosis múltiple e incluso han logrado controlar patologías mortales como el sida o incluso curarlas, como en el caso de la hepatitis C, y que nos han traído hasta las puertas de la medicina personalizada. Es difícil pensar que en otro marco hubiera podido producirse el hito de desarrollar vacunas contra la COVID-19 en menos de un año.

Y se ha constatado hasta qué punto un sector como la industria farmacéutica es estratégico en la sociedad moderna. Su iniciativa, su proyección internacional, su experiencia y capacidad organizativa y cooperativa han constituido un pilar fundamental para afrontar la pandemia. Más allá, es un sector líder en inversión en I+D y generación de conocimiento, moviliza a su alrededor la mayor parte de la inversión en investigación biomédica pública y privada y tiene un gran peso económico, que a su vez arrastra a otros sectores de la economía. Y su trabajo, como se ha dicho, impacta de manera directa en la salud y bienestar de las sociedades.

Esto es relevante en particular en el caso de España, donde es el sector industrial líder, junto a la automoción, en inversión en I+D, con el 19 % del total; líder también en producción y exportación de alta tecnología, y generador de empleo de alta calidad.

Las fortalezas que el sector ha mostrado ante la crisis se antojan también oportunidades ante el futuro inmediato de reactivación económica y, más a medio plazo, de revisión y reforzamiento del modelo productivo.

El liderazgo en investigación clínica, que se ha traducido en que España haya sido el primer país de Europa y el cuarto del mundo en ensayos clínicos contra el coronavirus, es una ventaja competitiva ante otros países en la atracción de mayor inversión internacional en este campo. El modelo español es ágil, resistente y de calidad, y tiene margen de crecimiento en un entorno de gran avance en la investigación biomédica.

La capacidad productiva de la industria farmacéutica en España, crucial para responder a las demandas sobrevenidas en los momentos críticos de la crisis y evitar problemas de desabastecimiento, muestra un tejido preparado para crecer en un momento en que la experiencia de la COVID-19 ha planteado en Europa si la dependencia de Asia en producción de principios activos y medicamentos esenciales es excesiva desde el punto de vista de la protección sanitaria.

En efecto, la producción de muchos medicamentos veteranos, ya sin protección industrial, pero de gran utilidad y uso masivo en multitud de síntomas y enfermedades, se ha ido desplazando paulatinamente a países asiáticos como China e India.

Desde la industria farmacéutica se han hecho propuestas tanto en el ámbito de la investigación clínica como en el de la producción, en el entendimiento de que, con un marco adecuado de diálogo y colaboración entre Administración e industria, se podría atraer más investigación y más producción de medicamentos. En el caso de la investigación clínica no solo se traduciría en inversión en los hospitales, que es donde se hacen los ensayos clínicos, sino también en mayor experiencia y conocimiento para los equipos médicos –lo que a su vez redundaría en mayor calidad asistencial– y en nuevas oportunidades de participar en ensayos para los pacientes. En producción se sumarían lo económico, dada la generación de tejido productivo, empleo y exportación que implicaría, y lo sanitario, puesto que participar de la producción de medicamentos esenciales aportaría una mayor protección estratégica para España en caso de crisis sanitaria.

BIBLIOGRAFÍA

https://www.farmaindustria.es/web/otra-noticia/coronavirus-laboratorios-farmaceuticos-y-centros-publicos-trabajan-para-desarrollar-un-tratamiento-en-tiempo-record/

https://www.ifpma.org/resource-centre/innovative-biopharmaceutical-industry-updates-on-covid-19-treatments-progress-and-warns-about-upholding-regulatory-standards-of-quality/

https://www.farmaindustria.es/web/pregunta_y_respuesta/la-industria-farmaceutica-supera-la-produccion-necesaria-de-vacunas-covid-con-380-acuerdos-de-licencia/

https://www.efpia.eu/news-events/the-efpia-view/blog-articles/equitable-access-to-innovative-covid-19-vaccines-in-africa-should-focus-on-healthcare-system-absorption-capacities-vaccine-confidence/

https://www.farmaindustria.es/web/reportaje/plantas-de-produccion-de-medicamentos-como-garantizan-el-suministro/

https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/laAEMPS/2021/docs/memoria-2020.pdf?x47028

https://www.farmaindustria.es/web/reportaje/los-ensayos-clinicos-recuperan-la-normalidad-tras-la-crisis-sanitaria/

https://www.farmaindustria.es/web/wp-content/uploads/sites/2/2021/03/Informe-El-valor-del-medicamento-desde-una-perspectiva-social-2021.pdf

Capítulo XV
Biología del SARS-CoV-2

Alfonso Ruiz-Bravo López[1, 2] y María Jiménez Valera[2]
[1] *Académico de número de la Academia Iberoamericana de Farmacia*
[2] *Departamento de Microbiología, Universidad de Granada*

INTRODUCCIÓN

Los coronavirus son virus zoonóticos, cuyo principal reservorio son los murciélagos. El enorme número de especies de murciélagos (más un millar), su dispersión mundial y su capacidad para adaptarse a ecosistemas urbanos son algunos de los factores que incrementan el riesgo de transmisión de componentes de su viroma (del que los coronavirus pueden llegar a representar más de una tercera parte) al ser humano, ya sea directamente o a través de otra especie de mamífero intermediaria; acontecimiento que ha ocurrido varias veces, en dos de ellas con agentes de patologías pulmonares graves como fueron el SARS-CoV («*severe acute respiratory síndrome related coronavirus*») y el MERS («*Middle East respiratory síndrome related coronavirus*»), antes del advenimiento del actual SARS-CoV-2 (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2020). Hace ya nueve años, una publicación en una revista científica de alto impacto se refería al riesgo de emergencia de nuevos coronavirus potencialmente peligrosos para el ser humano en estos términos: «... es posible que las condiciones ecológicas y demográficas actuales y proyectadas se estén acercando a un punto crítico. [...] se puede esperar que la transmisión acelerada de coronavirus de murciélagos y otros animales a humanos continúe y posiblemente aumente. Las autoridades de salud pública deben prepararse mediante el desarrollo de estrategias ampliamente aplicables para el diagnóstico rápido, la contención y el tratamiento y la vacunación contra las infecciones emergentes por coronavirus. Hemos sido advertidos dos veces en los últimos años...» (Graham *et al.* 2013). Repasar tales frases premonitorias tras haber sido abrumados por la pandemia de COVID-19 da que pensar: parece que las conexiones entre la comunidad científica y la sociedad no fueron suficientemente eficaces, porque la irrupción del SARS-CoV-2 fue sorpresiva y encontró a todo el mundo desprevenido. A mayor abundamiento, dos publicaciones sucesivas habían mostrado, mediante la creación de un coronavirus quimérico, que el riesgo de que un nuevo virus semejante al SARS-CoV emergiese a partir de coronavirus de murciélagos era, no solamente real, sino probable (Menachery *et al.* 2015; Menachery *et al.* 2016); los trabajos presentados en estas dos publicaciones fueron fuertemente criticados, por el peligro inherente a la creación en el laboratorio de virus con alto potencial patógeno para los humanos, pero desde luego no sirvieron de advertencia. En diciembre de 2019 el riesgo anunciado se materializó: varios centros de salud locales en la ciudad china de Wuhan informaron sobre varios casos de una neumonía vírica cuyo agente causal era desconocido; el 5 de enero de 2020, la OMS emite su primer parte al respecto en su boletín de brotes epidémicos; en el mismo mes, el día 9 la OMS da a conocer que el brote se debe a un nuevo coronavirus; el 14, ante los 41 casos confirmados de la nueva enfermedad, la OMS señala que «es posible que se esté produciendo una transmisión limitada entre seres humanos»; el 24 se detectan los primeros casos en Europa (Francia) y al día siguiente la OMS emite una declaración pública resaltando la importancia de prepararse en los planos local y nacional para detectar casos, analizar muestras y ofrecer atención clínica; en su alocución del día 30, el Director General de la OMS reconoce que «el brote mundial por el nuevo coronavirus constituye una

emergencia de salud pública de importancia internacional», pero el mismo día el Comité de Emergencias afirma que «está convencido de que todavía es posible interrumpir la propagación del virus, si los países aplican medidas sólidas para detectar pronto la enfermedad, aislar y tratar los casos, hacer seguimiento de los contactos y promover medidas de distanciamiento físico en las relaciones sociales que estén en consonancia con el riesgo». Se suceden informes y declaraciones; el 11 de febrero la OMS establece la denominación de «COVID-19» («*coronavirus disease-2019*»); el 7 de marzo una declaración de la OMS reconoce que se han superado los 100.000 casos y el 11 del mismo mes, el Director General declara en una rueda de prensa la existencia de una pandemia (la cronología actualizada de las respuestas de la OMS a la COVID-19 se puede consultar en https://www.who.int/es/news/item/29-06-2020-covidtimeline). Desde entonces, la enfermedad ha continuado su expansión, en sucesivas oleadas y con la aparición de diversas variantes del virus responsable, consecuencia de la acumulación de mutaciones en su genoma. A fecha de 24 de noviembre de 2023, la OMS registra un total de más de 772 millones de casos confirmados de COVID-19, con casi 7 millones de fallecimientos (https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update---24-november-2023).

La magnitud de la pandemia y su impacto en la salud y la economía han promovido una intensísima actividad investigadora encaminada a conseguir un mejor conocimiento del virus, para así proponer medios eficaces para combatirlo mediante la prevención por vacunas y la quimioterapia antiviral. Hay que considerar el enorme número de laboratorios y centros de investigación, dotados de los medios técnicos adecuados, que se han enrolado en ese esfuerzo. La primera consecuencia ha sido el aluvión creciente de publicaciones en revistas científicas: en 2019 obviamente las publicaciones sobre COVID-19 fueron escasas; el motor de búsqueda PubMed registra solo 23, de las que seis eran trabajos de revisión. En 2020, el número de publicaciones registradas en PubMed es ya abrumador: 93.833 publicaciones, de las que 11.155 fueron revisiones. Desde el inicio de la pandemia hasta diciembre de 2023, un total de 400.374 publicaciones, incluyendo 43.191 revisiones, han utilizado los términos «COVID-19» o «SARS-CoV-2» en sus textos.

El presente capítulo pretende presentar un compendio de los conocimientos actuales sobre el SARS-CoV-2: su taxonomía; las características del virus, de su genoma, las proteínas que codifica y las funciones que se les atribuyen; y el proceso de infección a nivel celular. No se escapa a los autores que esta información por fuerza es incompleta, dada la imposibilidad de examinar sistemáticamente el abigarrado arsenal de publicaciones; y que en un lapso de tiempo relativamente corto, se habrán acumulado nuevos conocimientos que ofrecerán un panorama más exacto de este virus y de su biología; pero se ha hecho un considerable esfuerzo para presentar datos contrastados, con la esperanza de que los contenidos de las secciones que siguen puedan ser de alguna utilidad a los lectores.

1. SITUACIÓN TAXONÓMICA

El término coronavirus designa a un grupo de virus cuyo genoma es una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva (es decir, con la misma secuencia de bases que los RNAs mensajeros) y que poseen cápsida de simetría helicoidal envuelta en una bicapa lipídica que contiene glicoproteínas (fig. 1).

El *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), creado en 1966, viene emitiendo periódicamente actualizaciones de la clasificación de los virus, con las correspondientes listas de especies encuadradas taxonómicamente, desde la primera que apareció en 1971 hasta la n.º 38 en 2022 (https://ictv.global/taxonomy), que es la vigente en las fechas en que se escribe este capítulo. Tradicionalmente, la clasificación de los virus se ha basado la comparación de características fenotípicas, pero en los últimos años se ha impuesto el análisis filogenético de una serie de genes distintivos, conocidos como «*Virus Hallmark Genes*», responsables de funciones clave en la replicación del virus y la morfogénesis del virión; ejemplos de ellos son los que codifican para RNA polimerasas dependientes de RNA, DNA polimerasas o transcriptasas inversas dependientes de RNA, helicasas de la superfamilia 3, proteínas principales de la cápsida con determinados modelos de plegamiento y endonucleasas de iniciación de la replicación según el modelo de círculo rodante. La aplicación de estos nuevos criterios se ha plasmado en la creación de megataxones y en el establecimiento de una clasificación basada en las relaciones filogenéticas. De acuerdo con el documento elaborado por el ICTV en 2022, se definen seis superreinos, uno de los cuales, *Riboviria*, contiene a los virus con genoma RNA (ya sea mono- o bicatenario) que utilizan para su replicación RNA-polimerasas dependientes de RNA que están relacionadas filogenéticamente, los cuales se incluyen en el reino *Orthornavirae*; en otro reino, *Pararnavirae*, se sitúan los virus que usan una retrotranscriptasa (DNA-polimerasa dependiente de RNA), incluso si su genoma es DNA (como es el caso del virus de la Hepatitis B). En el reino *Orthornavirae* hay cinco filos; uno de ellos, *Pisuviricota*, alberga virus con genoma RNA monocatenario de sentido positivo y virus con RNA bicatenario, distribuidos en tres clases; de ellas, la clase *Pisoniviricetes* contiene virus con genoma RNA monocatenario positivo

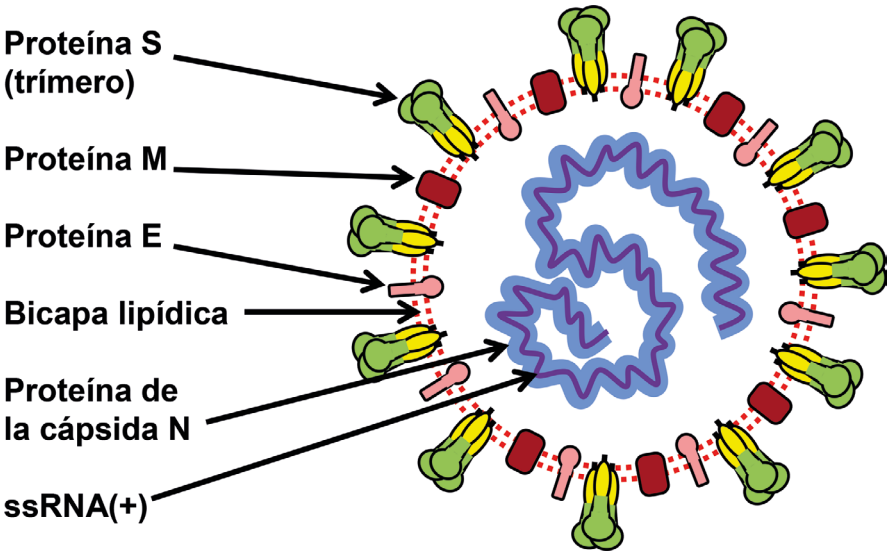


Figura 1. SARS-CoV-2: Estructura del virión. La nucleocápsida, de simetría helicoidal, está rodeada por una envoltura consistente en una bicapa lipídica, procedente de membranas celulares del compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (ERGIC); en dicha bicapa se insertan las proteínas S (spike), M (membrane) y E (envelope)

que infectan eucariotas pero no procariotas, y están agrupados en tres órdenes, uno de los cuales es el orden *Nidovirales*, con ocho subórdenes; de ellos, el suborden *Cornidovirineae* comprende una sola familia, *Coronaviridae*; en esta familia se reconocen tres subfamilias: *Letovirinae*, con el género *Alphaletovirus*, patógeno del molusco marino *Dolabella auricularia*; *Pitovirinae*, con el género *Alphapironavirus*, patógeno del salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*); y *Orthocoronavirinae*, que comprende los géneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus*.

Los reservorios de los virus pertenecientes a los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* son principalmente murciélagos y roedores, mientras que los de *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* son mayoritariamente aves; los coronavirus conocidos hasta ahora como patógenos humanos pertenecen a los géneros *Alphacoronavirus* y *Betacoronavirus* (Evans y Liu 2021).

Siguiendo la última clasificación del ICTV, el género *Alphacoronavirus* se divide en 15 subgéneros con un total de 26 especies. En el subgénero *Duvinacovirus* se ubica la especie *Human coronavirus 229E* (*HCoV-229E*), que causa resfriado común; y en el subgénero *Setracovirus*, la especie *Human coronavirus NL63* (*HCoV-NL63*), asimismo agente causal de resfriados, pero que en niños pequeños puede infectar el tracto respiratorio inferior produciendo desde laringitis hasta bronquiolitis.

En el género *Betacoronavirus* hay cinco subgéneros y 14 especies. En el subgénero *Embecovirus* se encuentran dos virus humanos, *Betacoronavirus 1* (*HCoV-OC43*) y *Human coronavirus HKU1* (*HCoV-HKU1*), ambos causantes de resfriado común. De las cuatro especies que hay en el subgénero *Merbecovirus*, solo una es patógena del ser humano: *Middle East respiratory síndrome related coronavirus* (*MERS-CoV*). Finalmente, el subgénero *Sarbecovirus* tiene una sola especie, *Severe acute respiratory síndrome related coronavirus*, a la cual pertenecen los virus SARS-CoV (también designado como SARS-CoV-1) y SARS-CoV-2.

Los primeros esquemas de clasificación de coronavirus se basaban en las relaciones antigénicas (reacciones cruzadas) entre sus proteínas S, pero este criterio fue sustituido por el análisis de secuencias de proteínas implicadas en la replicación (González *et al.* 2003). El *Coronaviridae Study Group*, perteneciente al ICTV y responsable de la taxonomía de esta familia, ha confirmado que la homogeneidad genómica dentro de la especie *Severe acute respiratory síndrome related coronavirus* es incluso mayor que la observada en otras especies de *Betacoronavirus*, aunque sí hay diversidad suficiente como para reconocer tres linajes: el primero está representado por el virus SARSr-CoV (de *SARS-related-Coronavirus*) BtKY72 (aislado de un murciélago en Kenia y también designado por su número de acceso al GenBank, KY352407); el segundo incluye al SARS-CoV-2 (junto con otros coronavirus de murciélagos aislados en Zheijiang); y el tercero, el más numeroso, contiene al SARS-CoV (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2020; Lu *et al.* 2020).

2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

2.1. Morfología

ViralZone, un recurso web del SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*), asigna a los viriones del género *Betacoronavirus* un diámetro de alrededor de 120 nm (https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species). Las imágenes de microscopía electrónica de SARS-CoV-2 corresponden a partículas aproximadamente esféricas, con

un viroplasma denso donde se ubica la nucleocápsida helicoidal, rodeado por una bicapa lipídica en la que se insertan glicoproteínas, una de las cuales sobresale formando «picos» o «espigas», a lo que debe su nombre (proteína S, de «*spike*») (Ke *et al.* 2020; Di *et al.* 2021). El diámetro promedio de los viriones, descontando los picos, es ligeramente inferior a 100 nm; los picos sobresalen poco más de 20 nm (Ke *et al.* 2020; Laue *et al.* 2021).

2.2. Proteínas estructurales

Los viriones de SARS-CoV-2 poseen cuatro proteínas estructurales (fig. 1), designadas con las letras S (*spike*), E (*envelope*), M (*membrane*) y N (*nucleocapsid*), de las que las tres primeras son glicoproteínas insertadas en la envoltura, mientras que N es la proteína constitutiva de la cápsida (Arya *et al.* 2021; Gong *et al.* 2021).

2.2.1. Proteína S

Los picos en forma de maza que sobresalen de la envoltura de SARS-CoV-2, dando al virión su aspecto característico de corona, están formados por trímeros de la glicoproteína S cuyo monómero, con un tamaño de 1.273 aminoácidos y una masa de 141.178 Da, es la mayor de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 (Arya *et al.* 2021; Nahalka 2021; información de UniProt sobre las características de la proteína en https://covid-19.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC2). La secuencia de referencia del NCBI para esta proteína es YP_009724390.1.

La estimación inicial de hasta 100 copias de trímeros S por virión (Bar-On *et al.* 2020) parece excesiva. Las observaciones de Klein *et al.* (2020) reducen este número a 48, aunque con un rango de dispersión muy grande. Los cálculos de Ke *et al.* (2020) llevan a una proporción aproximada de un trímero por 1.000 nm^2, que para un virión de 100 nm de diámetro resulta en ~ 25,5 picos por virión, lo que concuerda con los recuentos realizados por otros autores (Yao *et al.* 2020; Laue *et al.* 2021).

La proteína S es una típica proteína transmembrana de clase I, en la que se distinguen tres regiones: la parte extracelular o ectodominio, la región transmembrana y el tallo intracelular en el citosol (Kadam *et al.* 2021). La proteína está dividida en dos subunidades, S1, donde reside la zona de unión al receptor en la superficie celular, y S2, responsable de la fusión de la envoltura viral con la membrana celular (Arya *et al.* 2021; Evans y Liu 2021). Comenzando por el extremo amino-terminal del ectodominio, el péptido señal ocupa desde el aminoácido 1 al 13; a continuación, la subunidad S1 comprende desde al aminoácido 14 al 685, y en ella se sitúan el dominio amino-terminal NTD («*N-terminal domain*», aminoácidos 14 a 305) y el dominio de unión al receptor o RBD («*receptor-binding domain*», aminoácidos 319 a 541), que contiene la secuencia que se une al receptor (un bucle formado por los aminoácidos 440 a 506, designado como RBM, de «*receptor-binding motif*»); a partir del aminoácido 686 se inicia la subunidad S2, donde se encuentra el péptido de fusión (FP, de «*fusión peptide*», aminoácidos 788 a 806), las secuencias de repetición heptapéptido 1 (HR1, aminoácidos 912 a 984) y 2 (HR2, aminoácidos 1163 a 1213), la región transmembrana (TM, aminoácidos 1213 a 1237) y el tallo citosólico (CT, aminoácidos 1237 a 1273) que finaliza en el extremo carboxilo-terminal (Huang *et al.* 2020; Satarker *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Kadam *et al.* 2021) (fig. 2). Como se verá más adelante (sección 3.2.2), tras la unión del virus a la superficie celular y la modificación de S2 por proteasas, las secuencias HR1 y HR2 establecen una unión por puente de hidrógeno entre las serinas 929 y 1196; entre ambas secuencias hay una hélice central y un dominio conector, que participan en la fusión entre envoltura y membrana celular mediada por el FP (Wang *et al.* 2020).

2.2.2. Proteína M

La glicoproteína M, ubicada en la envoltura del SARS CoV-2, está constituída por 222 aminoácidos, con una masa de 25.147 Da (https://covid-19.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC5) y es la proteína estructural más abundante en el virión (Arya *et al.* 2021). Su secuencia de referencia en NCBI es YP_009724393.1. Consta de un ectodominio que se inicia en el extremo amino-terminal, seguido de tres hélices transmembrana (aminoácidos 22 a 37, 48 a 67 y 77 a 97) y del endo-dominio carboxilo-terminal (Arya *et al.* 2021; Kadam *et al.* 2021). La proteína M tiene interacciones homotípicas consigo misma y heterotípicas con las otras proteínas estructurales S, E y N, interacciones cruciales para el empaquetamiento de los genomas y el ensamblaje de los viriones hijos (Arya *et al.* 2021; Kadam *et al.* 2021); además, interacciona con enzimas celulares favoreciendo la proliferación viral e induciendo apoptosis (Satarker y Nampoothiri 2020). La proteína M induce autofagia, una de cuyas consecuencias es la inhibición de la respuesta de interferón de tipo I (Hui *et al.* 2021).

2.2.3. Proteína E

Con solamente 75 aminoácidos y una masa de 8.365 Da (https://covid-19.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC4), esta glicoproteína es la más pequeña de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 y está constituída por un ectodominio amino-terminal hidrófilo (aminoácidos 1 a 10), un dominio transmembrana (TMD) hidrófobo (aminoácidos 11 a 37)

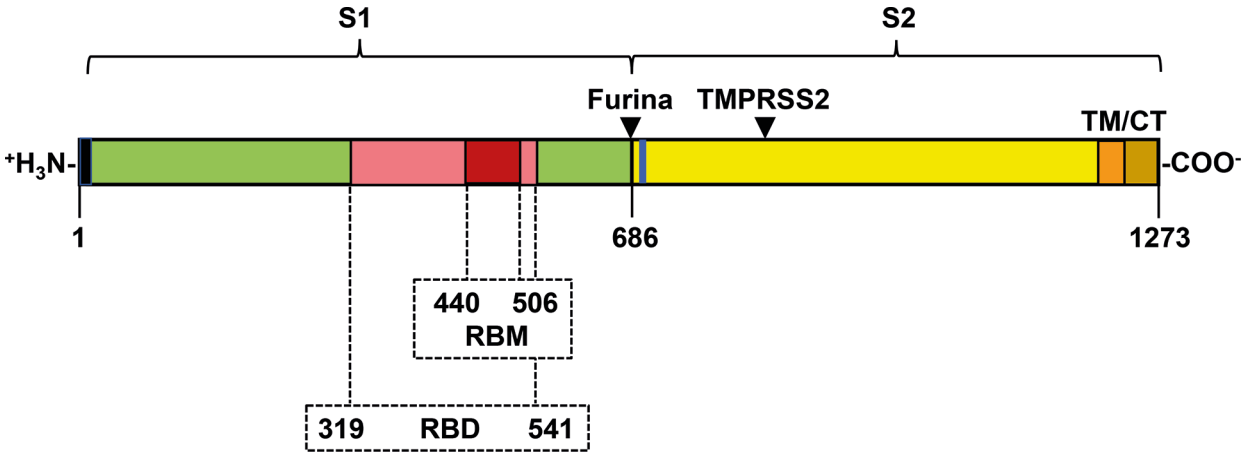


Figura 2. Representación lineal esquemática de la proteína S. Con un total de 1273 aminoácidos, consta de dos porciones, S1, que va del aminoácido 14 al 685 (los 13 primeros aminoácidos corresponden al péptido señal, rellenado en negro), y S2, del aminoácido 686 al extremo carboxilo-terminal. En S1 se encuentra el RBD (*receptor-binding domain*) que contiene la secuencia RBM (*receptor-binding motif*). Se muestran los sitios de escisión por furina (el «sitio multibásico», de las posiciones 682 a la 685), que rompe la unión entre S1 y S2 en 686; y por TMPRSS2 (cuyo sitio de escisión, entre la argininina en 815 y la serina en 816, se denomina S2'), que permite exponer el péptido de fusión (la banda azul en la posición de 788 a 806). TM, región transmembrana; CT, tallo citosólico

y un dominio o cola citosólica carboxilo-terminal hidrófilo (aminoácidos 38 a 75) (Arya *et al.* 2021). La secuencia de referencia del NCBI es YP_009724392.1. Las células infectadas producen gran cantidad de proteína E, pero solo una pequeña proporción se inserta en la envoltura de los viriones hijos: la mayor parte se localiza en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, donde ocurre el ensamblaje de la progenie viral (Cao *et al.* 2021).

El TMD de la proteína E es responsable de interacciones homotípicas que conducen a la formación de oligómeros, principalmente pentámeros con una topología que forma canales iónicos, los cuales se insertan en las membranas del retículo endoplásmico y Golgi para actuar como viroporinas (Arya *et al.* 2021; Cao *et al.* 2021). Las viroporinas constituyen una gran familia de proteínas ampliamente distribuidas en diferentes familias virales, principalmente en virus RNA; actúan como canales de iones que modifican el ambiente iónico celular, facilitando diversas etapas del ciclo viral, por ejemplo, protegiendo a la progenie viral del pH ácido en la luz del aparato de Golgi, que podría interferir con la maduración de los viriones que se ensamblan en él (Nieto-Torres *et al.* 2015). En general, los canales iónicos interrumpen el potencial de membrana y alteran la fisiología celular, favoreciendo la producción de viriones; en el caso concreto del SARS-CoV-2, la eliminación de la proteína E se traduce en una atenuación de la virulencia (Cao *et al.* 2021). Cuando las células infectadas detectan las alteraciones de la homeostasis iónica causadas por las viroporinas, ponen en marcha mecanismos defensivos, como la activación de inflamasomas; sin embargo, hay que tener presente que las respuestas inflamatorias excesivas contribuyen al daño tisular y son un componente de la inmunopatología que acompaña a las infecciones respiratorias graves (Nieto-Torres *et al.* 2015).

2.2.4. Proteína N

La proteína N, que constituye la cápside, consta de 419 aminoácidos y su masa es de 45.626 Da (https://covid-19.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC9). Su secuencia de referencia en NCBI es YP_009724397.2. La proteína N, que se produce en abundancia durante la infección, se une al RNA genómico para formar una nucleocápside helicoidal (Kang *et al.* 2020; Satarker y Nampoothiri 2020). El dominio amino-terminal (NTD) se extiende del aminoácido 48 al 174 y comprende la mayor parte de la región de unión al RNA; le sigue una región de enlace rica en serina y arginina, con numerosos sitios de fosforilación importantes para la localización de la proteína en la célula infectada y para sus interacciones con otras proteínas; y finalmente, un dominio carboxilo terminal (CTD) de carácter hidrófobo, responsable de interacciones homotípicas (dimerización), que comprende los aminoácidos 247 a 364 (Kang *et al.* 2020; Satarker y Nampoothiri 2020; Arya *et al.* 2021; https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi?scanfile=922032354823.scan.gz). A través del CTD, las proteínas N forman dímeros, que se ordenan asimétricamente en octámeros y finalmente se ensamblan en estructuras oligoméricas más grandes con forma de filamentos entrelazados; se supone que esta oligomerización aumenta la superficie de unión para un entrelazamiento óptimo con el RNA genómico (Cong *et al.* 2020).

La proteína N ejerce una diversidad de funciones. Como se ha indicado, es la proteína constituyente de la

nucleocápsida, que parece estar organizada como una sucesión de numerosos subcomplejos (alrededor de 35 en un virión) constituidos cada uno por una docena proteínas N superpuestas a unos 800 nucleótidos de RNA, formando lo que se ha comparado a una «cadena de perlas» que en su conjunto asemejan una G (Yao *et al.* 2020; Bracquemond y Muriaux 2021). La proteína N es esencial para el empaquetamiento del RNA de la progenie viral en las células infectadas (Bracquemond y Muriaux 2021); pero además está implicada en la regulación de la síntesis de RNA viral, tanto en la replicación del genoma como en la formación de RNAs mensajeros (Kang *et al.* 2020; Kadam *et al.* 2021). También participa en las interacciones entre el virus y la célula infectada, estando involucrada en la reorganización de la actina, la progresión del ciclo celular y la apoptosis, además de inhibir la producción de interferón de tipo I (IFN-I) en respuesta a la infección viral (Kang *et al.* 2020; Satarker y Nampoothiri 2020; Kadam *et al.* 2021).

2.3. Genoma

Aunque en promedio, los virus con RNA monocatenario de polaridad positiva poseen los genomas más pequeños (Campillo-Balderas *et al.* 2015), los coronavirus son la excepción, ya que sus genomas son los mayores de entre todos los virus RNA (Rahimi *et al.* 2021); incluso virus con RNA monocatenario de polaridad negativa que tienen cápsidas de dimensiones significativamente mayores, como los miembros de las familias *Rhabdoviridae* o *Filoviridae*, tienen genomas más pequeños (comparaciones hechas con datos obtenidos de https://viralzone.expasy.org/). Las secuencias genómicas del SARS-CoV-2 presentan tamaños entre 29,8 Kb y 29,9 Kb (Rahimi *et al.* 2021); el genoma de referencia es una cadena de polaridad positiva con 29.903 nucleótidos (Fernandes *et al.* 2020). Como en todos los coronavirus, el RNA genómico posee una caperuza («*Cap*») en su extremo 5' y una cola de poliadenilato en el extremo 3', a semejanza de los RNA mensajeros celulares (Fernandes *et al.* 2020; Kadam *et al.* 2021) (fig. 3). De hecho, en el proceso de infección el RNA genómico actúa como un mensajero, ya que es traducido parcialmente en los ribosomas para sintetizar proteínas no estructurales que pondrán en marcha la replicación del virus (ver la sección 3.3). La caperuza consiste en un nucleótido de guanina modificada cuyo extremo fosfato-5' se une al fosfato del extremo 5' del RNA y tanto ella como la cola de poliadenilato estabilizan al RNA protegiéndolo de la degradación por exonucleasas. La secuencia completa del genoma de referencia, incluyendo la cola que comprende desde la posición 29.871 a la 29.903, está accesible en GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_045512).

El genoma del SARS-CoV-2 contiene hasta 14 marcos de lectura abierta (ORFs, de «*open reading frames*»), que codifican un total de 31 proteínas (Zehra *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Rahimi *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021). De ellas, cuatro forman parte de la estructura del virión (proteínas S, M, E y N, descritas en la sección 2.2); 16 son proteínas no estructurales (Nsp, de «*non structural proteins*»), que se producen en la célula infectada y desempeñan diversos papeles en el ciclo de replicación del virus y en sus interacciones con la célula hospedadora; y 11 son proteínas accesorias, también producidas en la célula infectada, y cuyas funciones no se consideran esenciales para el virus, aunque intervienen en las interacciones con el hospedador y sus defensas (Zehra *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021).

Comenzando por el extremo 5' (protegido por la caperuza), se encuentran la secuencia líder (~ 70 nucleótidos) y una región no traducida (~ 230 nucleótidos), denominada 5'UTR (de «*5' untranslated region*»); a continuación, los ORFs 1a y 1ab (el ORF1ab contiene al 1a); el gen de la proteína S; el ORF3a; los genes de las proteínas E y M; los ORFs 6, 7a, 7b, 8b; el gen de la proteína N, que a su vez contiene el ORF9b (algunos autores incluyen un ORF14); el ORF10; la región no traducida 3'UTR y finalmente la cola de poliadenilato (Naqvi *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Kadam *et al.* 2021; Rahimi *et al.* 2021). Los genes que codifican para las proteínas estructurales S, M, E y N y las proteínas accesorias ocupan aproximadamente el 33 % del genoma; el resto corresponde a los genes de las proteínas no estructurales (Zehra *et al.* 2020) (fig. 3).

Al final de la secuencia líder, a unos 70 nucleótidos del extremo 5' del genoma, hay una secuencia reguladora de la transcripción designada como TRS-L («*leader transcription regulatory sequence*») (V'kovski *et al.* 2021). Otras secuencias similares, de seis nucleótidos de longitud, se encuentran en diferentes posiciones a lo largo del «cuerpo» del genoma (TRS-B, de «*body transcription regulatory sequence*»), al inicio de los ORFs; en el curso de la infección, la fusión entre la TRS-L y una TRS-B produce la formación de los RNAs subgenómicos (se omite la información comprendida entre ambas TRSs) complementarios (de polaridad negativa) que se tomarán como moldes para los diversos RNAs mensajeros (ver sección 3.4) (Fernandes *et al.* 2020; Romano *et al.* 2020; Ellis *et al.* 2021; Finkel *et al.* 2021; V'kovski *et al.* 2021).

Como se ha indicado anteriormente, en las células infectadas el RNA genómico actúa como un RNA mensajero, que se une a los ribosomas para traducir los dos primeros ORFs. La traducción del ORF1a se inicia en el codón AUG (nucleótidos 266 a 268) y finaliza en codón de terminación UAA (nucleótidos 13.481 a 13.483),

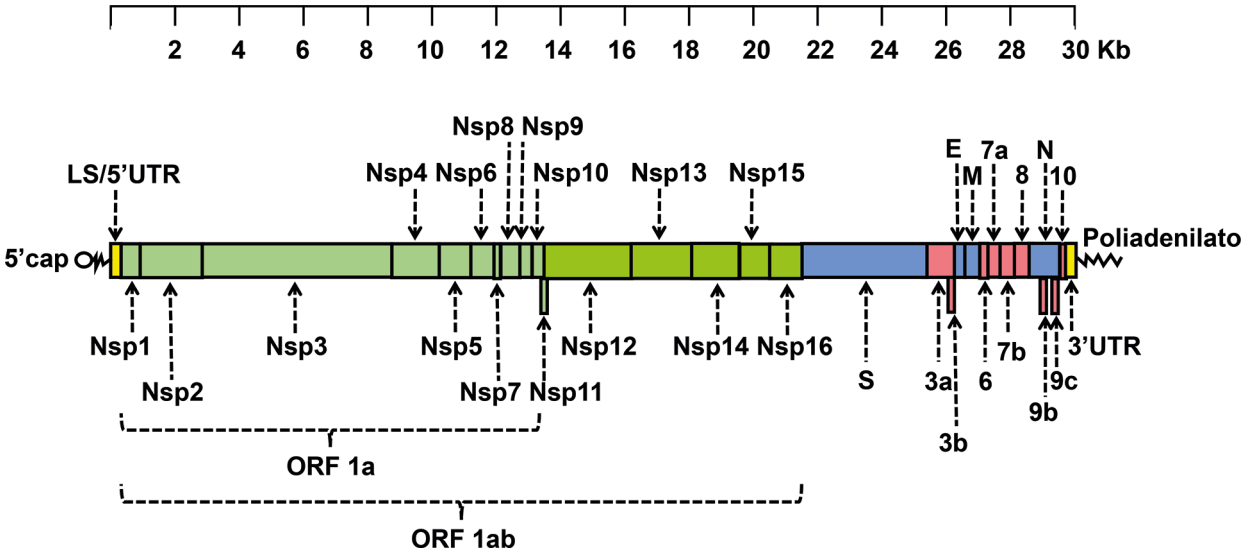


Figura 3. Organización del genoma del SARS-CoV-2. La estructura es la de un mRNA gigante, protegido por una caperuza («cap») en el extremo 5' y con una cola de poliadenilato en el 3'. En azul, los genes que codifican para proteínas estructurales S, E, M y N; en dos tonos de verde, los genes de las proteínas no estructurales Nsp1 a Nsp16; en rojo, los genes de las proteínas accesorias Orf3a a Orf10 (se representan solo los números). Hay dos ORFs que se traducen directamente a sendas poliproteínas: ORF1a, que abarca desde Nsp1 hasta Nsp11, y ORF1ab, que comprende desde Nsp1 hasta Nsp16. LS, secuencia líder («leader sequence»); UTR, región no traducida («untranslated region»)

produciendo la poliproteína pp1a de 4405 aminoácidos; esta poliproteína contiene 11 proteínas no estructurales (Nsp1 a Nsp11), dos de las cuales (Nsp3 y Nsp5) tienen actividad proteasa y entre ambas escinden a la propia pp1a en sus 11 componentes (Fernandes *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Gadhave *et al.* 2021). Sin embargo, entre ORF1a y ORF1b el RNA genómico presente una estructura terciaria peculiar (un «pseudonudo»), que ocasionalmente hace que el marco de lectura se desplace en un nucleótido, de forma que codón de terminación desaparece, con lo que la lectura se prolonga a lo largo del ORF1b, lo que supone añadir a pp1a 2.695 aminoácidos adicionales: el resultado es la poliproteína pp1ab, que contiene otras cinco proteínas no estructurales más (Nsp12 a Nsp16) (Fernandes *et al.* 2020; Ellis *et al.* 2021; Gadhave *et al.* 2021; Huston *et al.* 2021). La síntesis y procesamiento de estas poliproteínas se describe en la sección 3.3.

2.4. Proteínas no estructurales y proteínas accesorias

2.4.1. Proteínas no estructurales

Genéricamente, se denominan no estructurales a las proteínas codificadas por un genoma viral que se producen en las células infectadas, pero que no forman parte de las estructuras de los viriones. En el caso de los coronavirus, esta denominación se aplica a las proteínas codificadas por los ORFs 1 y 2, que inicialmente se sintetizan como poliproteínas pp1a y pp1ab y luego se individualizan para desempeñar papeles cruciales en la replicación y en las interacciones con la célula hospedadora.

Nsp1

Nsp1 comprende desde el aminoácido 1 al 180 en el extremo amino-terminal de las poliproteínas pp1a y pp1ab (Giri *et al.* 2021), de las que se escinde por la acción proteolítica de Nsp3 (Arya *et al.* 2021; V'kovski *et al.* 2021). La secuencia de referencia del NCBI es YP_009725297.1. Nsp1 se une, por su extremo carboxilo-terminal, al sitio de entrada del RNA en la subunidad 40S de los ribosomas de la célula infectada, bloqueando la traducción; este bloqueo debería afectar tanto a la traducción de los RNAs mensajeros celulares como de los virales; sin embargo, los RNAs virales parecen significativamente más eficientes que los celulares, por lo que en las condiciones de restricción de acceso a los ribosomas impuestas por Nsp1 los RNAs virales prevalecen sobre los celulares; es decir, en la competencia por acceder a los ribosomas que resten sin bloquear, ganan los RNAs virales, con el resultado de que la célula detiene la síntesis de proteínas propias pero produce proteínas virales (Schubert *et al.* 2020). Recientemente, se ha señalado que los RNAs mensajeros virales no se traducen mejor que los celulares, sino que es su mayor abundancia, resultado de sus altos niveles de transcripción, lo que determina que prevalezcan sobre los mensajeros celulares (Finkel *et al.* 2021).

Nsp2

Nsp2 es una proteína de 638 aminoácidos (ocupa desde las posiciones 181 a 818 de las dos poliproteínas), cuya

secuencia de referencia del NCBI es YP_009725298.1; interacciona con las proteínas celulares prohibitinas 1 y 2 (implicadas en la función mitocondrial y en la autofagia), lo que tiene como consecuencia limitar la supervivencia de la célula infectada (Giri *et al.* 2021; Kadam *et al.* 2021); al detener funciones celulares, podría resultar favorecida la replicación del virus, aunque el papel de esta proteína en la virulencia del SARS-CoV-2 no ha sido totalmente demostrado (Mariano *et al.* 2020).

Nsp3

Con 1.945 aminoácidos (del 819 al 2.763 en las poliproteínas), Nsp3 es la mayor de las proteínas codificadas por el genoma del SARS-CoV-2 (Arya *et al.* 2021; Giri *et al.* 2021). Su secuencia de referencia del NCBI es YP_009725299.1. Se trata de una proteína multifuncional, con varios dominios: comenzando por el extremo amino-terminal se encuentra el dominio Ubl1 (de «*ubiquitin-like*»), similar a la ubiquitina; la región hipervariable HVR; el macrodominio Mac1, también designado como macrodominio-X; los macrodominios Mac2, Mac3 y DPUP (de «*Domain Preceding Ubl2 and PL2pro*»), conocidos globalmente como SUDs (de «*SARS unique domains*», por ser exclusivos de SARS-CoV y SARS-CoV-2; según esta denominación, Mac2 es SUD-N, Mac3 es SUD-M y DPUP es SUD-C); un segundo dominio similar a ubiquitina, denominado Ubl2; un dominio catalítico con actividad proteasa, llamado PLpro (de «*papain-like protease*») o PLpro2 (en otros coronavirus hay un dominio PLpro1 en el extremo amino-terminal); el dominio NAB (de «*nucleic-acid binding*»); la secuencia βSM («*betacoronavirus-specific marker*»); dos dominios trans-membrana (TM1 y TM2), que se insertan en la membrana del retículo endoplásmico, flanqueando al dominio 3Ecto (también llamado «dominio de dedo de zinc» o «*zinc-finger domain*», está situado en la luz del retículo endoplásmico); a continuación de TM2, la región AH («*amphipathic helix*»); finalmente, los dominios Y1 (presente en todos los miembros del orden *Nidovirales*) y CoV-Y (presente solo en los coronavirus); excepto los dominios transmembrana TM1 y TM2 y el intraluminal 3Ecto, todo el resto de Nsp3 es citosólico (Lei *et al.* 2018; Alhammad *et al.* 2021; Arya *et al.* 2021).

¿Qué funciones se asocian a las distintas regiones de Nsp3? El dominio Ubl1 se une a secuencias AUA en el RNA de cadena sencilla y también a la proteína estructural N; ya que la proteína N está implicada en la transcripción, el hecho de que se una, ya sea a las secuencias reguladoras de la transcripción (TRSs) en el RNA, o al dominio Ubl1 de Nsp3, podría regular el cambio de la transcripción a la traducción de los RNAs virales (Lei *et al.* 2018). El papel del otro dominio similar a ubiquitina, Ubl2, no está claro; se ha propuesto que ambos dominios pudieran interaccionar con proteínas diana de la ubiquitina (proteína celular que se asocia a las proteínas que han de ser recicladas, marcándolas para su destrucción en el proteosoma), interfiriendo tal vez con la transducción de señales antivirales del en la célula hospedadora (Lei *et al.* 2018). HVR es una región de carácter ácido (rica en glutámico), cuya función no se conoce con precisión.

Mac1 interacciona con la inmunidad inespecífica, aunque se han expuesto hipótesis contradictorias al respecto, ya que según algunos podría participar en la inducción de una respuesta excesiva de citocinas proinflamatorias (que causaría daño tisular), mientras que otros proponen que facilita a los coronavirus el escape a los mecanismos antivirales de la inmunidad natural (Lei *et al.* 2018). Se ha demostrado que Mac1 es capaz de catalizar la eliminación de ADP-ribosa de las proteínas a través de su actividad hidrolasa; la ADP-ribosilación de proteínas es una modificación postraduccional implicada en la transducción de señales, la respuesta inmunitaria, la reparación de daños en el ADN y el estrés celular, por lo que la des-ADP-ribosilación catalizada por Mac1 podría ser una forma de suprimir las respuestas defensivas antivirales; en cualquier caso, Mac1 es un importante factor de virulencia para los coronavirus (Frick *et al.* 2020; Alhammad *et al.* 2021; Arya *et al.* 2021). Recientemente se ha comunicado que un mutante de SARS-CoV-2 carente de Mac1 (por deleción completa) no ve afectada su capacidad para replicarse en cultivos celulares, pero en el modelo de infección de ratones hACE2 (ratones transgénicos que expresan el receptor ACE2 humano y por tanto son susceptibles a la infección con SARS-CoV-2) la carga viral en los pulmones está significativamente reducida y los animales no desarrollan enfermedad (Alhammad *et al.* 2023).

Los macrodominios Mac2 y Mac3 de la región SUD se unen a cuádruplex G, preferentemente en RNAs celulares (por ejemplo, RNAs mensajeros de proteínas implicadas en la inmunidad) y también podrían intervenir en la replicación del virus (Lavigne *et al.* 2021). Conviene recordar aquí que los cuádruplex G son estructuras de cuatro cadenas estabilizadas por tétradas de guanina unidas de forma no canónica (es decir, en las que no se encuentran los pares de bases canónicos AT y CG) que aparecen tanto en el DNA como en el RNA y a los que se atribuyen funciones reguladoras aún no bien definidas (Kolesnikova y Curtis 2019). Es interesante reseñar que los macrodominios de Nsp3 del SARS-CoV-2 presentan una notable divergencia en las secuencias de aminoácidos con los de la proteína homóloga del SARS-CoV, pero esto influye poco en las estructuras, que están bien conservadas, por lo que las diferencias de secuencias deben tener una escasa repercusión funcional (Alhammad *et al.* 2021).

La actividad proteolítica de Nsp3 radica en el dominio PLpro, que es una cisteína-proteasa similar a la papaína (Mariano *et al.* 2020; V'kovski *et al.* 2021). A diferencia de otros coronavirus y al igual que MERS-CoV y SARS-CoV, el SARS-CoV-2 posee un único dominio PLpro (Rut *et al.* 2020). La tríada catalítica del sitio activo de este dominio está compuesta por los aminoácidos cisteína, histidina y aspártico (en las posiciones 111, 272 y 286, respectivamente) y la secuencia diana es un tetrapéptido con leucina, un aminoácido variable (arginina, lisina o asparagina), y dos glicinas (secuencia LXGG) (Osipiuk *et al.* 2021; Sanders *et al.* 2021), que se encuentra entre las proteínas Nsp1 y Nsp2, Nsp2 y Nsp3, y Nsp3 y Nsp4 dentro de las poliproteínas pp1a y pp1ab (Rut *et al.* 2020). Por tanto, la actividad proteolítica de PLpro causa la liberación de proteínas Nsp1, Nsp2 y de la propia Nsp3, que son necesarias para la replicación del virus (Arya *et al.* 2021; V'kovski *et al.* 2021). Pero además, PLpro escinde las cadenas de poliubiquitina y de ISG15 de las proteínas de la célula hospedadora, lo que contribuye a la evasión del virus ante mecanismos de la inmunidad innata (Mariano *et al.* 2020; Rut *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Giri *et al.* 2021; Osipiuk *et al.* 2021). La desubiquitinación dificulta la respuesta inflamatoria del huésped; por ejemplo, la desubiquitinación de la proteína IκBα previene su degradación, pero como su función es retener fuera del núcleo al factor de transcripción NF-κB, la persistencia de IκBα impide a NF-κB participar en la transcripción de genes que codifican para citocinas porinflamatorias y para IFN-I. En cuanto a ISG15 (una de las muchas proteínas inducidas por los IFN-I), su unión a proteínas virales y celulares inhibe la replicación viral por mecanismos aún no bien conocidos (posiblemente por interferir con la oligomerización de proteínas o alterar su localización subcelular, también por prevención de la degradación del factor IRF-3, lo que prolonga la expresión de los genes de IFN-I). Un estudio comparativo de las actividades de PLpro de SARS-CoV y SARS-CoV-2 ha mostrado que PLpro de SARS-CoV-2 es menos efectiva en la desubiquitinación (y en consecuencia, su bloqueo de la activación de NF-κB es menor) y más efectiva en la escisión de ISG15 (Shin *et al.* 2020). Además de la eliminación de ISG15, PLpro de SARS-CoV-2 es capaz de escindir a IRF-3 (Moustaqil *et al.* 2021), lo que revela mecanismos redundantes en la atenuación de la respuesta de IFN-I.

Además de las funciones reseñadas, Nsp3 es esencial para la formación del complejo de replicación y transcripción (RTC, de «*replication and transcription complex*») de los coronavirus. Mediante los dominios TM1 y TM2, Nsp3 se inserta en la membrana del retículo endoplásmico donde constituye un a modo de andamio que recluta a otras proteínas no estructurales, principalmente Nsp4 y Nsp6, formando un complejo que modifica la membrana generando vesículas de doble membrana (DMV, «*double-membrane vesicles*») perinucleares en las que se asienta el RTC y donde ocurre la síntesis del RNA viral (Lei *et al.* 2018; Mariano *et al.* 2020; V'kovski *et al.* 2021). La capacidad para interaccionar con Nsp4 y Nsp6 y formar DMVs reside en la región carboxilo-terminal de Nsp3, siendo esencial para esta interacción el dominio luminal 3Ecto (Mariano *et al.* 2020).

Nsp4

Esta proteína de 500 aminoácidos (posiciones 2.764 a 3.263 en las poliproteínas) con secuencia de referencia del NCBI YP_009725300.1 (Giri *et al.* 2021), es liberada de las poliproteínas pp1a y pp1ab por la acción proteolítica de Nsp5 (Arya *et al.* 2021; Moustaqil *et al.* 2021). Nsp4 es unida por el dominio 3Ecto de Nsp3 (Lei *et al.* 2018) para formar parte del complejo Nsp3-Nsp4-Nsp6 que, como se ha indicado anteriormente, genera las DMVs (Giri *et al.* 2021)

Nsp5

Nsp5 es una proteína de 306 aminoácidos (del 3.264 al 3.569) cuya secuencia de referencia del NCBI es YP_009725301.1 (Giri *et al.* 2021). Es una cisteína-proteasa, designada como «proteasa principal» (Mpro, de «*main protease*») o «proteasa similar a las proteasas 3C» (3CLpro, de «*3C-like protease*») por su parecido con las proteasas 3C de la familia *Picornaviridae* (Arya *et al.* 2021). Las proteasas 3C son unas endopeptidasas que escinden la poliproteína resultante de la traducción del genoma de los picornavirus, pero también interfieren con algunas funciones de la célula hospedadora (Sun *et al.* 2016). La secuencia diana de Nsp5 es leucina-glutamina-X, donde X puede ser serina, alanina o glicina, y escinde las poliproteínas de SARS-CoV-2, comenzando por la unión entre Nsp4 y ella misma, hasta liberar los ocho componentes que restan desde Nsp4 a Nsp11, ambos inclusive, en la poliproteína pp1a, o el total de doce componentes (desde Nsp4 hasta Nsp16) en el caso de pp1b (Arya *et al.* 2021; Moustaqil *et al.* 2021). El sitio catalítico de la proteasa es la diada constituída por una histidina en la posición 41 y una cisteina en la 145, y para conseguir una actividad óptima la proteína ha de dimerizarse (Mariano *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Osipiuk *et al.* 2021). Como en el caso de PLpro, también 3CLpro actúa sobre sustratos celulares, lo que le lleva a interaccionar con funciones de la célula infectada. Especial relevancia tiene el hecho de que la proteína NLRP12 sea un sustrato de 3CLpro (Moustaquil *et al.* 2021), ya que NLRP12 (siglas de «*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 12*») es un potente supresor de inflamación, por lo que su destrucción favorece la liberación

de citocinas proinflamatorias. Moustaquil *et al.* (2021) han propuesto que la escisión de IRF3 por PLpro explica la atenuación de la respuesta de IFN tipo I que ocurre en las primeras etapas de las infecciones por SARS-CoV-2, mientras que la escisión de NLRP12 mediada por 3CLpro podría explicar la respuesta hiperinflamatoria («tormenta de citocinas») observada en etapas posteriores en los casos graves de COVID-19.

Nsp6

Esta proteína de 290 aminoácidos (del 3.570 al 3.859 en las poliproteínas) y secuencia de referencia del NCBI YP_009725302.1 está implicada, como ya se dicho, en la formación de las DMVs mediada por el complejo Nsp3-Nsp4-Nsp6 (Giri *et al.* 2021). Adicionalmente, Nsp6 interfiere con la capacidad de la célula para utilizar la autofagia como defensa antiviral. La autofagia es un procedimiento que las células ponen en marcha en condiciones de inanición, para recuperar aminoácidos a partir de la degradación de algunas proteínas propias, pero también es un mecanismo eficaz para la destrucción de patógenos intracelulares y el procesamiento de sus antígenos para presentarlos a los linfocitos T (Levine 2005). Al igual que ocurre con otros virus, la infección por coronavirus induce la respuesta celular de autofagosomas, pero Nsp6 promueve la formación, desde el retículo endoplásmico, de autofagosomas de pequeño diámetro y esta restricción de la expansión que ocurre normalmente tras la fusión del autofagosoma con los lisosomas podría reducir la degradación de proteínas virales y la consiguiente presentación de antígenos a los linfocitos T (Cottam *et al.* 2014).

Nsp7 y Nsp8

Nsp7 consta de 83 aminoácidos y Nsp8 de 198; son dos proteínas contiguas en las poliproteínas (de los aminoácidos 3.860 al 3.942 y 3.943 al 4.140, respectivamente) y sus secuencias de referencia del NCBI son YP_009725303.1 e YP_009725304.1 (Giri *et al.* 2021). Ambas proteínas forman parte, en calidad de cofactores, del RTC; se les ha asignado una función de primasa, que sintetizarían un cebador para la síntesis del RNA viral por la Nsp12 (Arya *et al.* 2021; Giri *et al.* 2021). Se ha comprobado que la presencia de estos cofactores incrementa significativamente la eficiencia de Nsp12 en su actividad de polimerasa de RNA dependiente de RNA (Kadam *et al.* 2021).

Nsp9

Esta proteína de 113 aminoácidos (posiciones 4.141 a 4.253 en las poliproteínas) y secuencia de referencia del NCBI YP_009725305.1 tiene capacidad de unión al RNA monocatenario y posiblemente estabiliza los RNAs virales durante la replicación o la traducción, protegiéndolo de la degradación por ribonucleasas (Giri *et al.* 2021).

Nsp10

Es una proteína de 139 aminoácidos (del 4.254 al 4.392) y su secuencia de referencia del NCBI es YP_009725306.1 (Giri *et al.* 2021). Posee un único dominio y funciona como una proteína de andamio para formar un complejo con Nsp14 y Nsp16, responsables de la formación de la caperuza («*cap*») del RNA viral (Arya *et al.* 2021). Nsp10 es el cofactor que inicia el *capping* activando a los otros dos componentes del complejo (Giri *et al.* 2021).

Nsp11

Este pequeño péptido de 13 aminoácidos, cuya secuencia de referencia del NCBI es YP_009725312.1, ocupa en las poliproteínas las posiciones 4.393 a 4.405 (Gadhave *et al.* 2021), que antes de su descubrimiento habían sido asignadas a la parte inicial de Nsp12 (Giri *et al.* 2021). El pseudonudo responsable del corrimiento del marco de la traducción del RNA que permite pasar de pp1a a pp1ab se sitúa en la secuencia que codifica para Nsp11 (Gadhave *et al.* 2021). Hasta el presente, no se han descrito funciones concretas para este péptido.

Nsp12

Nsp12 es una RNA-polimerasa dependiente de RNA (también llamada RdRp, de «*RNA-dependent RNA polymerase*»); es decir, fabrica RNA tomando como molde RNA de polaridad complementaria, lo que permite producir, en primer lugar, RNAs de polaridad negativa, subgenomicos y genómicos, usando el RNA genómico como molde; y posteriormente, RNAs subgenómicos (mensajeros) y RNAs genómicos de la progenie viral, tomando como moldes los correspondientes RNAs de polaridad negativa. La secuencia de referencia del NCBI para esta proteína es YP_009725307.1, y abarca los aminoácidos de las posiciones 4.393 a 5.324 de la pp1ab para un total de 932 aminoácidos (Giri *et al.* 2021), aunque recientemente se ha establecido que los 13 primeros corresponden a Nsp11. Posee un dominio extenso con actividad RdRp y otro dominio más pequeño, en la zona amino-terminal, con actividad nucleotidil-transferasa, denominado NiRAN («*nidovirus RdRp-associated nucleotidyltransferase*») (Wu *et al.* 2020). Recientemente se ha demostrado que el dominio NiRAN actúa como una guanilil-transferasa para participar en la formación de la caperuza que protege el extremo 5' del RNA viral (Yan *et al.* 2021). Nsp12 se asocia a los cofactores Nsp7 y Nsp8 para formar el RTC que realiza la replicación del genoma viral y su transcripción en RNAs mensajeros subgenómicos, y puede sintetizar RNA tanto de forma independiente como dependiente de cebador, usando Mn^{2+} como

cofactor metálico (Giri *et al.* 2021). Otras proteínas no estructurales pueden unirse al RTC, entre ellas la helicasa Nsp13 (Arya *et al.* 2021). Se ha acuñado la expresión «RTC extendido» para el conglomerado plenamente funcional en la síntesis de RNAs virales constituido por una Nsp7, dos Nsp8, una Nsp12, dos Nsp13, un RNA molde-cebador y una Nsp9 (Yan *et al.* 2021).

Nsp13

La proteína Nsp13, con 601 aminoácidos (del 5.325 al 5.925 de la pp1ab) y secuencia de referencia del NCBI YP_009725308.1, es una helicasa que desenrolla el RNA bicatenario que se forma durante la replicación y la generación de RNAs mensajeros del virus (Giri *et al.* 2021) y que probablemente participa en el proceso de corrección de errores por Nsp14 que contribuye a la fidelidad de la replicación del RNA (Chen *et al.* 2020). Además, Nsp13 posee actividad RNA 5'-trifosfatasa, necesaria para la formación de la caperuza, en la que también están implicadas Nsp10 (responsable del «andamiaje» del complejo de metilación), Nsp14 (exonucleasa y guanina-N7-metiltransferasa) y Nsp16 (2'-O-metil-transferasa) (Arya *et al.* 2021; V'kovski *et al.* 2021; Yan *et al.* 2021).

Nsp14

Nsp14 está constituida por 527 aminoácidos (del 5.926 al 6.452 de la pp1ab) y su secuencia de referencia del NCBI es YP_009725309.1 (Giri *et al.* 2021). Esta proteína bifuncional posee en su región aminoterminal un dominio exonucleasa (ExonN) que escinde nucleótidos del extremo 3' del RNA y en la región carboxilo-terminal un dominio con actividad N7-metil-transferasa (Arya *et al.* 2021). Por su actividad ExonN, Nsp14 desempeña una función correctora de errores de incorporación de base, escindiendo del extremo 3' del RNA naciente los nucleótidos mal incorporados; este mecanismo corrector solo ha sido descrito en Nidovirales, estando ausente en la replicación del resto de virus con genoma RNA que, en consecuencia, se caracterizan por sus altas tasas de mutación (Eckerle *et al.* 2007). En virtud de su capacidad para metilar la guanina en su posición N7, Nsp14 participa (junto con Nsp10, Nsp12, Nsp13 y Nsp16) en la formación de la caperuza del RNA viral (Arya *et al.* 2021; Giri *et al.* 2021; V'kovski *et al.* 2021).

Nsp15

NSp15 es una proteína de 346 aminoácidos (posiciones 6.453 a 6.798 de la pp1ab) con secuencia de referencia del NCBI YP_009725310.1 (Giri *et al.* 2021). Nsp15 posee tres dominios: el amino-terminal y el central constituyen la mayor parte de la interfaz sede de las interacciones homotípicas (para la formación de hexámeros), mientras que el carboxilo-terminal posee el sitio activo de su actividad enzimática; el hexámero es una endorribonucleasa con especificidad por el uracilo (Arya *et al.* 2021). Esta endorribonucleasa, que usa cationes Mn^{2+} como cofactor, es exclusiva de los miembros del orden Nidovirales que son patógenos de vertebrados (Giri *et al.* 2021). Como se ha indicado en la sección 2.3, el RNA genómico posee en el extremo 3' una cola de poliadenilato, que al fabricar el RNA complementario de polaridad negativa se convierte en una cola de poliuridilato en el extremo 5' de la nueva cadena; esta cola de poliuridilato es un motivo reconocido por receptores de la inmunidad innata (es decir, es un PAMP, siglas de «*pathogen-associated molecular patterns*»); al escindir los nucleótidos de uracilo del RNA negativo, Nsp15 evita su reconocimiento por los sensores celulares y limita las respuestas defensivas del hospedador (Arya *et al.* 2021).

Nsp16

La secuencia de referencia YP_009725311.1 del NCBI corresponde a esta proteína de 298 aminoácidos (posiciones 6.799 a 7.096 de la pp1ab), con actividad 2'-O-metil-transferasa (Giri *et al.* 2021). Nsp16 interviene en la etapa final de la formación de la caperuza: una vez que Nsp14 ha metilado la guanina, Nsp16 cataliza la metilación de la ribosa unida al primer nucleótido transcrito (al que se ha unido la guanina de la caperuza), que en SARS-CoV-2 es adenosina (Mariano *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Yan *et al.* 2021).

2.4.2. Proteínas accesorias

Las proteínas accesorias son también proteínas no estructurales, que están codificadas por ORFs ubicados en el tercio del genoma que finaliza en el extremo 3', en la misma región donde se localizan los genes que codifican para las cuatro proteínas estructurales; a diferencia de las Nsps, no son esenciales para la replicación del virus (motivo por el cual, hasta el momento presente, han sido menos estudiadas que las Nsps), pero desempeñan funciones importantes en la patogénesis, que han sido revisadas recientemente por Hurtado-Tamayo *et al.* (2023).

Orf3a

El marco ORF3a se ubica entre los genes de las proteínas estructurales S y M, y su producto Orf3a, cuya secuencia de referencia del NCBI es YP_009724391.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_009724391.1), contiene 275 aminoácidos, lo que hace de ella la mayor de las proteínas accesorias del SARS-CoV-2 (Redondo *et al.* 2021). Es una proteína transmembrana multifuncional que estructuralmente pertenece a la familia de las viroporinas, actuando como canal para cationes como Ca^{2+} y K^{+} (Mariano *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021).

La Orf3a del SARS-CoV-2 induce apoptosis a través de una vía extrínseca iniciada por la escisión de la caspasa-8, aunque lo hace con menos eficiencia que la proteína homóloga de SARS-CoV (Arya *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021). Su capacidad para interaccionar con Nsp3 se ha relacionado con la formación de DMVs, y sus interacciones con las proteínas estructurales N, M y S la implican en el ensamblaje y la gemación de los viriones hijos (Mariano *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Giri *et al.* 2021). Se ha descrito que la proteína Orf3a de SARS-CoV activa al factor de transcripción NF-κB y al inflamasoma NLRP3, acciones ambas que disparan la respuesta de citocinas proinflamatorias (Siu *et al.* 2019); extrapolando esta actividad a la Orf3a del SARS-CoV-2, se ha propuesto que este sea un mecanismo conducente a la «tormenta de citocinas» en pacientes con COVID-19 (Arya *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021). Curiosamente, el efecto activador de Orf3a sobre NF-κB es antagónico del efecto inhibidor descrito para Nsp3; en cambio, la activación del inflamasoma NLRP3 es sinérgica con la inactivación del inhibidor NLRP12 por Nsp5 (ver sección 2.4.1). Como se ha indicado al describir las actividades de Nsp5, es posible que los efectos, a veces contrapuestos, de las proteínas virales producidas en la célula infectada sigan una secuencia temporal que explicaría la evolución de la patogénesis (Moustaquil *et al.* 2021). Finalmente, cabe señalar que la Orf3a de SRAS-CoV-2 localizada en el endosoma tardío bloquea la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, es decir, impide el vertido de las enzimas líticas de los lisosomas en los fagosomas (Miao *et al.* 2021).

Orf3b

La superposición de genes es un resultado de la evolución genómica que permite que un mismo conjunto de nucleótidos codifique para distintas proteínas. La secuencia que codifica para Orf3b se superpone con el extremo 3' de ORF3a (Redondo *et al.* 2021). Este péptido de solo 22 aminoácidos es mucho menor que la proteína homóloga de SARS-CoV, con 153 aminoácidos; sin embargo, es más potente como inhibidor de la respuesta de IFN-I (Mariano *et al.* 2020; Redondo *et al.* 2021). Esta actividad es redundante con la atenuación de la producción de interferones o de sus efectos antivirales, descrita para la proteína estructural N (sección 2.2.4), para Nsp3 (sección 2.4.1) y para Orf6 y Orf7a (ver más adelante), lo que pone de manifiesto la capacidad del SARS-CoV-2 para evadir uno de los principales mecanismos antivirales de la inmunidad innata.

Orf3c

El marco ORF3c se superpone cerca del inicio del ORF3d, que a su vez se superpone al extremo 5' del ORF3a, y su producto es una proteína de 41 aminoácidos con un dominio transmembrana, cuya posible función se desconoce (Redondo *et al.* 2021).

Orf3d

El marco ORF3d se superpone al extremo 5' del ORF3a, donde abarca la mitad de la secuencia del ORF3c y se extiende hacia el extremo 3' (Redondo *et al.* 2021). Orf3d es una proteína de 57 aminoácidos, cuya función no ha sido establecida con precisión (Redondo *et al.* 2021).

Orf6

El marco ORF6, ubicado al inicio de la región entre los genes de las proteínas estructurales E y N, se encuentra en los genomas de todos los virus del subgénero *Sarbecovirus*, pero no en los demás miembros del género *Betacoronavirus* (Redondo *et al.* 2021); este gen se traduce en una proteína de 61 aminoácidos cuya secuencia de referencia en el NCBI es YP_009724394.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_009724394.1). La proteína Orf6 interfiere con el transporte del factor de transcripción STAT1 del citoplasma al núcleo celular, con lo que bloquea la producción de proteínas antivirales inducidas por los IFN-I (Mariano *et al.* 2020; Giri *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021). Vemos aquí, por tanto, otro mecanismo más de inhibición de la resistencia antiviral mediada por interferones.

Orf7a

El marco ORF7a, contiguo a ORF6, codifica para una proteína de 121 aminoácidos, con secuencia de referencia YP_009724395.1 en el NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1796318603). Orf7a es una proteína transmembrana que consta de un péptido señal N-terminal, un ectodominio, una región transmembrana y un motivo de di-lisina citoplásmica de cinco aminoácidos (lisina, arginina, lisina, treonina y glutámico) que interviene en la localización de la proteína en el retículo endoplásmico y su transporte al aparato de Golgi (Giri *et al.* 2021; Arya *et al.* 2021). Orf7a parece ser otro factor más que inhibe los mecanismos antivirales inducidos en las células por los IFN-I, posiblemente mediante el bloqueo del factor de transcripción STAT2 (Redondo *et al.* 2021). Investigaciones recientes han mostrado que ectodominio de Orf7a del SARS-CoV-2 se une eficientemente a los monocitos de sangre periférica humana, lo que tiene una doble consecuencia: por una parte, reduce la capacidad de estas células para presentar antígenos a los linfocitos T (facilitando, por tanto, la evasión del virus frente a la respuesta inmune específica), pero por otra induce una liberación masiva de quimiocinas y citocinas proinflamatorias, contribuyendo así al daño tisular en los pulmones (Giri *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021). Por tanto,

podría existir una redundancia en los efectos de Nsp5, Orf3a y Orf7a en el desencadenamiento de la «tormenta de citocinas».

Orf7b

Contiguo al marco ORF7a se encuentra el ORF7b, que codifica una proteína de 43 aminoácidos (uno menos que la homóloga de SARS-CoV) (Redondo *et al.* 2021). Su secuencia de referencia en el NCBI es YP_009725318.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_009725318.1). Es una proteína integral de membrana que se localiza en el aparato de Golgi y cuyas funciones no son bien conocidas, aunque parece favorecer la apoptosis (Mariano *et al.* 2020; Redondo *et al.* 2021) y podría participar en la inducción de la tormenta de citocinas (Yang *et al.* 2021). Se ha descrito mimetismo entre Orf7b y una proteína humana que actúa como receptor olfativo, lo que ha llevado a proponer que la infección con SARS-CoV-2 podría romper, por reacción cruzada, la tolerancia frente a dicho receptor y desencadenar una respuesta autoinmune transitoria que explicaría la pérdida del olfato registrada como uno de los síntomas típicos de la COVID-19 (Khavinson *et al.* 2021).

Orf8

El gen ORF8 se encuentra entre el ORF7b y el gen de la proteína estructural N (Redondo *et al.* 2021), y su producto es la proteína Orf8 de 121 aminoácidos y con YP_009724396.1 como secuencia de referencia en el NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1796318604). El gen ORF8 es exclusivo del SARS-CoV-2; en otros coronavirus, como el SARS-CoV, hay dos fragmentos, ORF8a y OR8b, a partir de los cuales debe haberse originado ORF8 (Redondo *et al.* 2021). Se trata de un gen hipervariable, con tendencia a sufrir deleciones y a recombinarse con genes homólogos de otros coronavirus, todo lo cual puede favorecer la adaptación del virus al hospedador humano (Zinzula 2021). La proteína Orf8 presenta, en su extremo amino-terminal, una secuencia señal que la dirige al retículo endoplásmico, seguida de un dominio similar a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Tan *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Zinzula 2021). Hay toda una variedad de genes virales que codifican proteínas con dominios similares a las inmunoglobulinas, los cuales parecen descender evolutivamente de genes que han sido adquiridos de los hospedadores, y cuyos productos conservan propiedades inmunomoduladoras que interfieren con los mecanismos defensivos del hospedador (Zinzula 2021). Las funciones de la proteína Orf8 son objeto de estudio, ya que variantes del SARS-CoV-2 con deleciones en ORF8 causan una patología más leve, con menor liberación de citocinas proinflamatorias y menor afectación en la función pulmonar (Redondo *et al.* 2021). Orf8 deprime la expresión de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I, de «*class I major histocompatibility complex*») en las células infectadas (una función que no se ha encontrado en las proteínas de SARS-CoV Orf8a y Orf8b), lo que interfiere con la presentación de antígenos a las células T citotóxicas, favoreciendo la evasión del virus frente a uno de los mecanismos de la inmunidad específica (Mariano *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Zinzula 2021). Concretamente, Orf8 se une a los productos del MHC-I mientras están en el retículo endoplásmico y los redirige a la vía de degradación por autofagia (Zinzula 2021). Además, Orf8 antagoniza tanto la producción de IFN-I como sus efectos antivirales en las células (Mariano *et al.* 2020; Redondo *et al.* 2021) e interfiere con la respuesta al estrés celular causado por la acumulación de proteínas mal plegadas, previniendo la apoptosis (Arduini *et al.* 2023). La deleción del gen ORF8 genera mutantes parcialmente atenuados en el modelo de infección experimental de ratones K18-hACE2, lo que confirma la importancia de Orf8 como factor de virulencia (Bello-Perez *et al.* 2023). Curiosamente, la proteína Orf8 no es retenida en el retículo endoplásmico, sino que es secretada por la célula infectada, pudiéndose detectar en los sobrenadantes de cultivos celulares inoculados con el virus y en el suero de pacientes con COVID-19 (Redondo *et al.* 2021).

Orf9b y Orf9c

ORF9b y ORF9c son otro ejemplo de genes superpuestos a otro gen; ambos son ORFs de expresión alternativa dentro del gen que codifica para la proteína estructural N (Arya *et al.* 2021; Redondo *et al.* 2021). Al parecer, no todas las cepas de SARS-CoV-2 poseen estos dos ORFs (Michel *et al.* 2020). Orf9b es una proteína de 97 aminoácidos (Arya *et al.* 2021) con actividad ligasa de ubiquitina; promueve la ubiquitinación, para su degradación en el proteosoma, de una proteína mitocondrial, lo que interfiere en las relaciones entre mitocondrias y retículo endoplásmico, comprometiendo la respuesta de IFN-I y otros mecanismos de la inmunidad innata (Mariano *et al.* 2020). También promueve la pérdida de moléculas de la familia de los receptores para la citocina TNF («*tumor necrosis factor*»), que son reguladores positivos de la respuesta de IFN-I; la degradación de estas moléculas tiene un efecto inhibidor sobre esta respuesta antiviral (Mariano *et al.* 2020; Redondo *et al.* 2021). En cuanto a Orf9c, un informe preliminar sugiere que atenúa varios mecanismos defensivos, como pueden ser las vías de señalización celular en respuesta a IFN-I, la señalización inducida por la interleucina 6 y el procesamiento y presentación de antígenos por células epiteliales a linfocitos T (información recogida por Redondo *et al.* 2021).

Orf10

El último de los ORFs vecino al extremo 3' del genoma del SARS-CoV-2 es el ORF10, que codifica para una proteína de 38 aminoácidos cuya secuencia de referencia en el NCBI es YP_009725255.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1798174256). Esta proteína es exclusiva del SARS-CoV-2 y su función no ha sido concretada todavía (Redondo *et al.* 2021), aunque recientemente se ha asociado con una evolución clínica grave, posiblemente por perturbar la expresión de genes del hospedador relacionados con la inmunidad (Haltom *et al.* 2023).

3. INFECCIÓN CELULAR

3.1. Receptores del virus en la superficie celular

El primer paso de una infección viral es la unión del virión a la superficie de la célula diana. Para que esta unión sea fuerte e irreversible, deben existir en la superficie celular moléculas que actúen como receptores con afinidad suficiente por ligandos de la superficie del virión. Zhou *et al.* (2020) y Hoffmann *et al.* (2020) fueron los primeros en establecer que el SARS-CoV-2 utiliza el mismo receptor celular que su pariente próximo el SARS-CoV, la enzima convertidora de angiotensina II (ACE2). Esta enzima, codificada por un gen ubicado en el cromosoma X, es una proteína transmembrana de tipo I (el dominio extracelular contiene el extremo N-terminal y el anclaje en la superficie celular es a través del dominio transmembrana C-terminal), de 805 aminoácidos y una masa molecular de ~ 92,5 Kdal, con actividad carboxipeptidasa; sus principales sustratos fisiológicos son las angiotensinas I y II; al convertir la angiotensina II en angiotensina 1-7 contrarresta su acción vasoconstrictora (https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYF1#sequences).

3.1.1. Expresión de ACE2

Aunque ACE2 se expresa en un amplio rango de tejidos (enterocitos, túbulos renales, cardiomiocitos, endotelio vascular, vesícula biliar, tracto respiratorio...), lo cierto es que, cuantitativamente, su expresión en el tracto respiratorio en condiciones normales es muy limitada, en comparación con otros tejidos, lo que resulta intrigante en un virus que, aunque pueda infectar distintos tipos de células, es primariamente un patógeno respiratorio (Hikmet *et al.* 2020). A raíz del brote epidémico de SARS-CoV, que utiliza el mismo receptor ACE2, se investigó su expresión en el tracto respiratorio, detectándose con cierta abundancia en la superficie apical de las células epiteliales bien diferenciadas y en una pequeña población de células alveolares de tipo 2 (Jia *et al.* 2005). Las células alveolares o neumocitos se conocen clásicamente con las siglas AEC (de «*alveolar epithelial cells*»), y pertenecen a dos tipos diferenciados, 1 y 2 (Rock y Hogan 2011); más recientemente se las designa como AT1 y AT2 (de «*alveolar epithelial type 1*» o «*alveolar epithelial type 2*» *cells*) (Desai *et al.* 2014). Las AT1 son células de citoplasma muy extendido, de escaso espesor, que tapizan la mayor parte del alvéolo y a través de las cuales ocurre el intercambio de gases, mientras que las AT2 ocupan mucho menos espacio, y segregan el surfactante necesario para mantener abiertos los alvéolos y evitar su colapso (Rock y Hogan 2011; Desai *et al.* 2014).

Investigaciones más recientes sobre el receptor principal del SARS-CoV-2 han mostrado que ACE2 tiene altos niveles de expresión en el epitelio nasal y en la mucosa oral, lo que explica su fácil transmisión por aerosoles y gotitas de saliva (Liu *et al.* 2020; Ashraf *et al.* 2021). En las ramas bronquiales la expresión es sensiblemente menor, detectándose en células secretoras (Lukassen *et al.* 2020). En el pulmón, se ha confirmado que la expresión de ACE2 se concentra en una subpoblación de células AT2 (Lukassen *et al.* 2020; Zhao *et al.* 2020; Zou *et al.* 2020; Ashraf *et al.* 2021). Aunque, en efecto, la expresión global de ACE2 en el tracto respiratorio es baja (Hikmet *et al.* 2020; Lukassen *et al.* 2020; Ashraf *et al.* 2021), se considera suficiente para el establecimiento de la infección por SARS-CoV-2 (Zou *et al.* 2020; Beyerstedt *et al.* 2021); además, es de gran interés el hallazgo de que la producción de interferones en respuesta a la infección viral induce la expresión de ACE2 en células epiteliales del tracto respiratorio, lo que incrementaría la proporción de células diana para el SARS-CoV-2 (Hikmet *et al.* 2020; Ziegler *et al.* 2020).

Por otra parte, el hecho de que, en comparación con los adultos, los niños presenten una menor expresión de ACE2 en el epitelio nasal y en las células epiteliales bronquiales puede ser uno de los factores determinantes de la menor gravedad y distinta presentación clínica de la COVID-19 en ellos (Beyerstedt *et al.* 2021).

El ligando de ACE2 en la envoltura del virión es la proteína S que, como se describirá más adelante (sección 3.2), debe sufrir una escisión proteolítica para promover la entrada de la nucleocápsida en la célula.

3.1.2. Correceptores

Actualmente, ACE2 es la única proteína de la superficie celular identificada como receptor principal para SARS-CoV-2, pero otras proteínas celulares intervienen en el proceso de unión y entrada del virus, actuando como correceptores o cofactores. Una de ellas es la neuropilina-1 (NRP-1), una proteína codificada por un gen del cromosoma 10, que está implicada en vías de señalización celular

y se expresa en numerosos tejidos y órganos, incluido el pulmón (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8829). NRP-1 no es un receptor primario, ya que no se une directamente a la proteína S intacta, sino que se une a un extremo que queda expuesto tras la escisión proteolítica de S; sin embargo, el SARS-CoV-2 puede infectar *in vitro* células que no expresan ACE2, pero con tasas de infección muy inferiores a las registradas en las mismas células que si expresan ACE2 (Zhang *et al.* 2021). Se han señalado otros posible cofactores que podrían tener importancia en la unión y entrada del virus, como son CD147 (conocida como basigina, implicada en procesos de reconocimiento intercelular), receptores de fosfatidilserina y heparán sulfato (Evans y Liu 2021).

3.1.3. ¿Otros receptores?

Partiendo del hecho de que SARS-CoV y SARS-CoV-2 comparten el receptor ACE2, pero el último es capaz de infectar un rango mayor de tejidos y órganos, en muchos de los cuales la expresión de ACE2 está limitada a pocas células, Gu *et al.* (2021) han realizado un análisis genómico de posibles receptores alternativos. Estos autores seleccionaron 5.054 proteínas de membrana, de las que doce mostraron afinidad por la proteína S de SARS-CoV-2. De especial interés son las interacciones de S con KREMEN1 (*kringle containing transmembrane protein 1*) y con ASGR1 (*asialoglycoprotein receptor 1*), ya que ambas proteínas transmembrana permiten la infección de células por SARS-CoV-2 (pero no por SARS-CoV) tanto *in vitro* como *in vivo* en ausencia de ACE2. KREMEN1 es receptor de la proteína DKK1 (*dickkopf 1*), que antagoniza la vía de señalización Wnt; dado que la señalización de Wnt/β-catenina es crucial para la renovación de las células de las papilas gustativas y la percepción del gusto, la interacción de SARS-CoV-2 con KREMEN1 podría explicar la frecuente pérdida del gusto en los pacientes de COVID-19 (Gu *et al.* 2021). La posibilidad de utilizar la tríada de receptores ACE2/ KREMEN1/ ASGR1 podría explicar el tropismo multiorgánico del SARS-CoV-2.

Un aspecto de gran interés es el posible papel de anticuerpos no neutralizantes en facilitar la infección de células que, como los monocitos/macrófagos, poseen receptores para la parte constante de las inmunoglobulinas (parte Fc). De esta manera, viriones recubiertos de anticuerpos podrían usar el receptor para Fc para unirse a la célula e ingresar en ella por endocitosis, lo que contribuiría a extender la infección. Este riesgo ha sido considerado para distintos grupos de virus, incluyendo virus respiratorios como el SARS-CoV, ya que podría ser un grave inconveniente en el caso de vacunas que induzcan tales anticuerpos facilitadores (Taylor *et al.* 2015). Sin embargo, un estudio ha mostrado que, a diferencia del MERS-CoV y del coronavirus humano del resfriado común 229E, ni SARS-CoV ni SARS-CoV-2 se replican en macrófagos humanos, ni siquiera en presencia de anticuerpos no neutralizantes (García-Nicolás *et al.* 2021); ciertamente, este estudio no deja claro si SARS-CoV-2 no es incorporado a través de los receptores para Fc o si lo que ocurre es que los macrófagos son células no permisivas para la infección (es decir, células en las que el virus puede entrar pero no es capaz de replicarse).

3.2. Unión al receptor, fusión con la membrana citoplásmica y entrada en la célula

Además de establecer la unión con el receptor celular ACE2, la glicoproteína S, que forma la espiga o pico característica de la envoltura de los coronavirus, promueve la fusión de la envoltura con la membrana citoplásmica de la célula diana. Como se ha indicado en la sección 2.2.1, la proteína S consta de dos subunidades, S1 y S2, de las que S1 es responsable de la unión al receptor y S2 media la fusión.

3.2.1. Unión al receptor

En la envoltura del virión, la proteína S se encuentra en forma de trímeros (Arya *et al.* 2021; Evans y Liu 2021). Los análisis estructurales han mostrado que la proteína S puede adoptar dos conformaciones, en una de las cuales el RBD se encuentra oculto por los azúcares de la glicoproteína (conformación «cerrada» o «abajo», que es inaccesible al receptor ACE2) y en la otra está expuesto (conformación «abierta» o «arriba», accesible al receptor); la transición de «abajo» a «arriba» expone el sitio de unión al receptor (RBM) ubicado en S1, el cual forma una concavidad en la que encaja ACE2 (Duan *et al.* 2020; Arya *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2021) (fig. 4). La interacción entre el RBM y el receptor ACE2 se estabiliza mediante 14 enlaces de puente de hidrógeno y un puente salino (Arya *et al.* 2021). A diferencia de SARS-CoV, en SARS-CoV-2 el equilibrio entre las dos conformaciones del RBD está desplazado hacia la conformación «cerrada», lo que beneficia al virus, ya que obstaculiza la neutralización por anticuerpos, pero también contrarresta la mayor avidez que el RBD de SARS-CoV-2 posee por ACE2, en comparación con SARS-CoV (Evans y Liu 2021). Una consecuencia de esto es que, siendo la afinidad del RBD de SARS-CoV-2 por el receptor de 10 a 20 veces mayor que la del RBD de SARS-CoV (Wu *et al.* 2020), la afinidad real con la que ambos virus enteros se unen a ACE2 es parecida, ya que el RBD de SARS-CoV-2 está la mayor parte del tiempo en la conformación «cerrada» (Evans y Liu 2021).

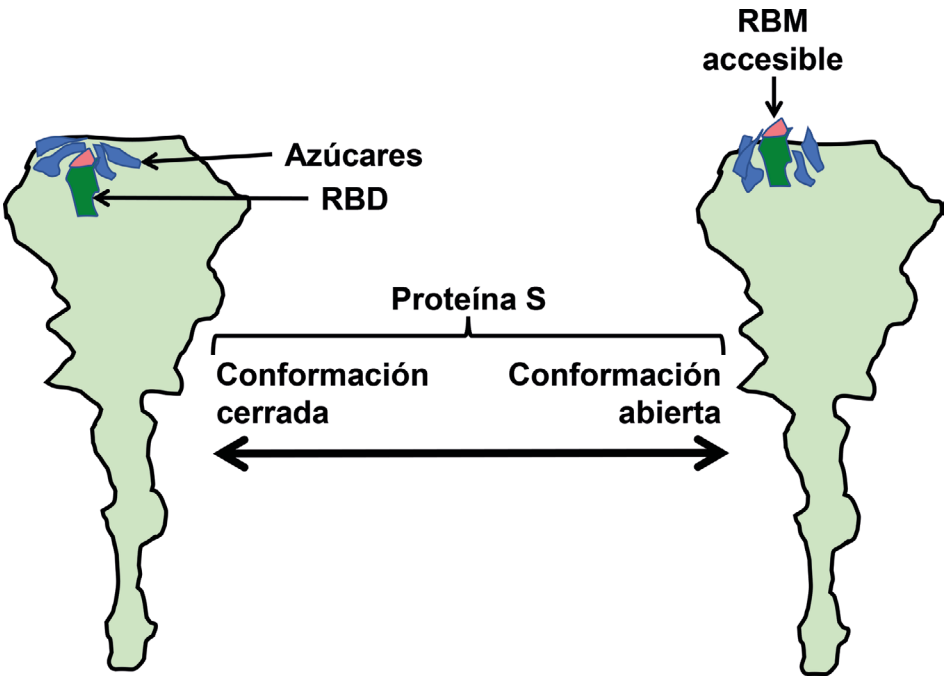


Figura 4. La proteína S en sus configuraciones cerrada («down») y abierta («up», «open»). En la configuración cerrada (izquierda de la imagen), el RBD se encuentra oculto por restos de azúcares de la glicoproteína; estos azúcares se separan en la configuración abierta (derecha de la imagen), con lo que el RBM emerge quedando accesible al receptor celular ACE2. Se representan solo restos de azúcares (en azul) implicados en la accesibilidad del RMB (en rojo)

3.2.2. Fusión con la membrana y entrada en la célula

La entrada de virus en la célula hospedadora puede ocurrir a partir de la adherencia de viriones a la superficie celular o por paso desde una célula infectada a una no infectada mediante fusión celular. En el caso de los virus con envoltura, la entrada de los viriones requiere la fusión entre la envoltura y una membrana celular. Esta fusión está facilitada por proteínas virales y puede ocurrir a pH neutro, en cuyo caso la envoltura fusiona con la membrana citoplásmica, o a pH ácido, lo que conlleva la endocitosis del virión para que la posterior acidificación del endosoma permita la fusión de la envoltura con la membrana endosomial; los coronavirus se han incluido clásicamente entre los virus que entran por endocitosis (Alsaadi y Jones, 1019), pero se sabe que algunos de ellos utilizan ambas vías de entrada en la célula (Kooi *et al.* 1991), incluyendo el SARS-CoV (Wang *et al.* 2008). También en el caso de SARS-CoV-2 han sido descritas las dos vías (fig. 5).

La entrada del SARS-CoV-2 en las células necesita la acción previa de proteasas celulares sobre la proteína S. En la subunidad S2 se localizan la secuencia de fusión y las dos heptadas (secuencias de siete aminoácidos polares e hidrofóbicos) repetitivas HR1 y HR2, que aseguran el enrollamiento de la proteína (Arya *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2021). En el final de la subunidad S1 que forma el límite con el inicio de S2 hay un sitio multibásico de escisión reconocido por proteasas como la furina (fig. 2); este sitio, que no se encuentra en la proteína S del SARS-CoV, es una secuencia prolina-arginina-arginina-alanina que se localiza en los aminoácidos 682 a 685 (Walls *et al.* 2020; Papa *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2021) y es uno de los factores responsables de la mayor eficiencia infectante del SARS-CoV-2 (Evans y Liu 2021). La furina es una enzima que pertenece a la familia de la proproteína convertasa de tipo subtilisina (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5045 ; https://www.uniprot.org/uniprot/P09958#names_and_taxonomy). La disociación de las subunidades S1 y S2, mediada por la furina, elimina el bloqueo que S1 ejerce sobre S2, facilitando la posterior acción de otras proteasas celulares cuya acción es necesaria para liberar el péptido de fusión que forma parte de S2; por ello, la infectividad de SARS-CoV-2 disminuye muy significativamente (aunque no desaparece) como consecuencia de deleciones o mutaciones en el sitio de escisión de furina (Walls *et al.* 2020; Evans y Liu 2021) y de la acción de inhibidores de furina (Siri *et al.* 2021). Es posible que otras proteasas puedan asumir la función de la furina en ausencia de esta, aunque con menor eficacia, ya que en células carentes de furina la infectividad del virus disminuye de forma muy notable (Papa *et al.* 2021). Además de propiciar la acción de las proteasas necesarias para exponer el péptido de fusión, la escisión por furina libera el extremo carboxilo-terminal de S1, al que se une el correceptor neuropilina anteriormente mencionado, lo que fortalece la unión del virus a la superficie celular (Canturi-Castelvetri *et al.* 2020; Daly *et al.* 2020).

La entrada del virus por fusión con la membrana citoplásmica requiere de la acción de una proteasa celular transmembrana designada con las siglas TMPRSS2

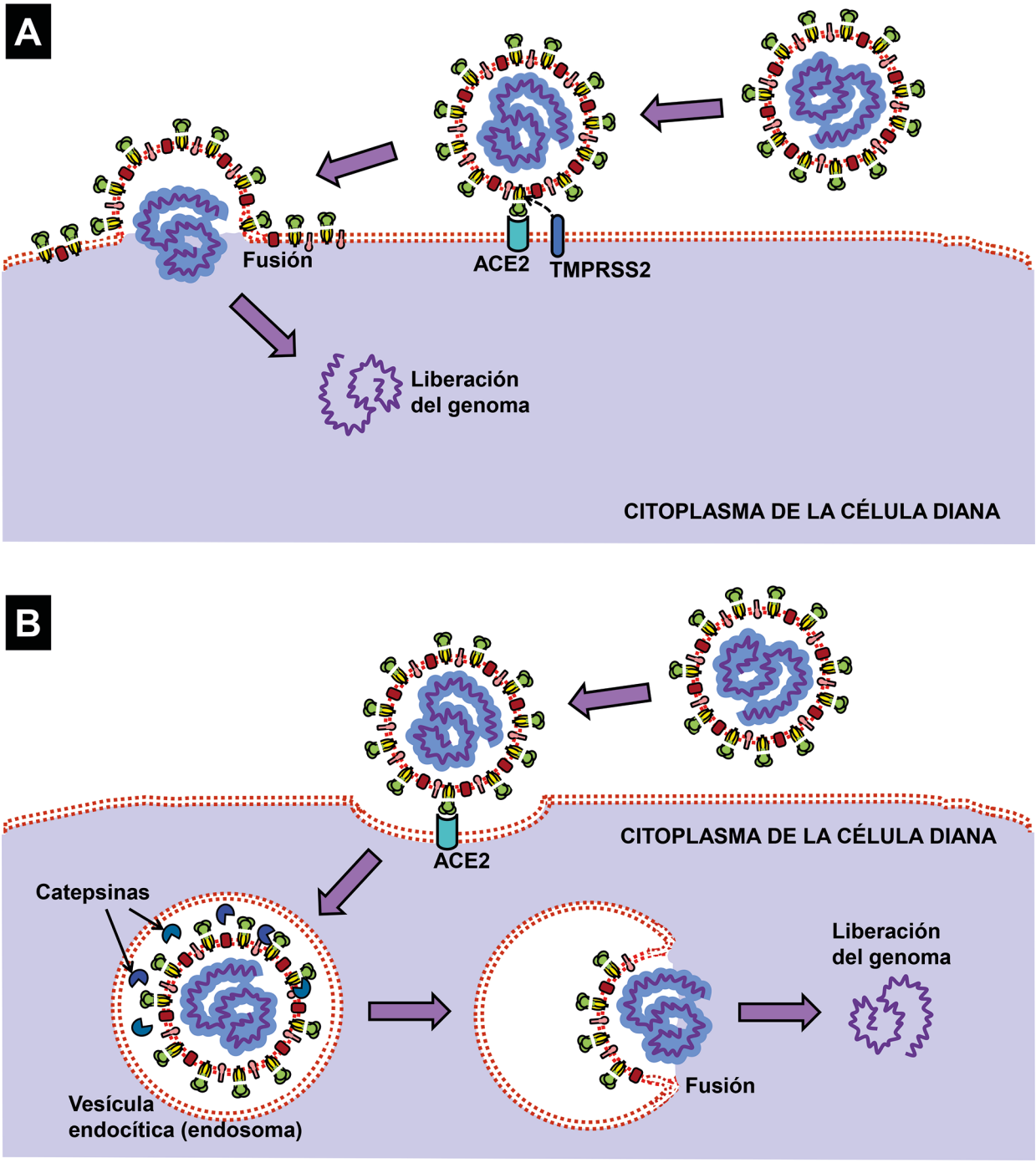


Figura 5. Vías de entrada del SARS-CoV-2 en las células. A) entrada por fusión de la envoltura viral con la membrana citoplásmica: tras la unión del RMB al receptor ACE2, la proteasa TMPRSS2 actúa sobre la proteína S, cuyas subunidades S1 y S2 han sido previamente separadas por acción de la furina, lo que facilita el acceso de TMPRSS2 a S2'; la escisión en S2' permite que el péptido de fusión actúe fusionando la envoltura viral con la membrana citoplásmica, lo que hace que la nucleocápsida entre en el citoplasma. B) Entrada por endocitosis: en células que carecen de actividad TMPRSS2 suficiente, el virión unido a ACE2 es endocitado; las catepsinas endosomiales B y L actúan sobre S desnudando al péptido de fusión, que promueve la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomial

(de «*transmembrane protease serine 2*»), codificada por un gen ubicado en el cromosoma 21 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7113 ; https://www.uniprot.org/uniprot/O15393), que se expresa en el epitelio prostático y de otros muchos tejidos, incluidas las vías respiratorias y los alvéolos (Zhang *et al.* 2021). La secuencia diana para TMPRSS2 se sitúa dentro de S2 (fig. 2), con el sitio de escisión en el aminoácido 815, y se designa como S2' (Kadam *et al.* 2020); como se ha indicado antes, la disociación previa de S1 y S2 por la furina facilita el acceso de

TMPRSS2 a S2'. La escisión mediada por TMPRSS2 tiene varias consecuencias: el péptido de fusión queda expuesto y las dos heptadas repetitivas HR1 y HR2 interaccionan entre sí, lo que causa la formación de un haz con seis formas helicoidales que constituye el núcleo de fusión, el cual actúa acercando la envoltura viral y la membrana citoplásmica para fusionarlas (Zhang *et al.* 2021).

Sin embargo, la secuencia de acontecimientos propuesta por Zhang *et al.* (2021) para la entrada del SARS-CoV-2 en las células, coincidente con el esquema gráfico que, en un principio, presentó el recurso web ViralZone, parece no ser la correcta. La clave es el lugar y momento de actuación de la furina, que ocurre principalmente en el complejo trans-Golgi (Evans y Liu 2021). Trans-Golgi es la parte del aparato de Golgi más alejada del retículo endoplásmico, y por donde las proteínas procesadas salen hacia compartimentos intracelulares o hacia la superficie celular. La proteína S de algunos coronavirus se escinde en sus dos subunidades tras la unión del virión a la superficie celular, mientras que en otros casos la escisión ocurre tras su síntesis en la célula infectada, durante el proceso de maduración de la proteína en la red de Golgi; SARS-CoV-2, al igual que MERS-CoV, figura en este último grupo (Walls *et al.* 2020; Jackson *et al.* 2021). Según esto, cuando las células infectadas por SARS-CoV-2 liberan la progenie viral, estos viriones presentan la proteína S ya escindida en sus subunidades S1 y S2, aunque ambas se mantienen asociadas de forma no covalente (Duan *et al.* 2020; Jackson *et al.* 2021). El proceso así descrito es el presentado actualmente (consultado en diciembre de 2023) en el esquema ofrecido en ViralZone (https://viralzone.expasy.org/9096). Este sitio web ofrece una diversidad de recursos, internos (representaciones gráficas, esquemas) y externos (acceso a varias fuentes de gran interés), en https://viralzone.expasy.org/9056.

Cuando el virus, tras su unión al receptor ACE2, entra por endocitosis, la subunidad S2 es escindida por las proteasas endosomiales catepsinas B y L (Evans y Liu 2021). El papel de la catepsina L parece ser especialmente relevante en la entrada por esta vía (Smieszek *et al.* 2020; Jackson *et al.* 2021). Las catepsinas son proteasas lisosomiales con actividad exo- y endopeptidasa que requieren para su acción el pH ácido resultante del bombeo de protones en el endosoma (Jackson *et al.* 2021). La catepsina L es una proteasa implicada en el catabolismo intracelular de proteínas y está codificada por un gen del cromosoma 9 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1514). La catepsina L escinde la unión de S1 y S2 en un sitio próximo pero distinto al de la furina, entre los aminoácidos treonina y metionina en las posiciones 696 y 697 (Smieszek *et al.* 2020). Por ello, la entrada por endocitosis no requiere la acción previa de la furina (Takeda 2021), aunque puede verse facilitada por ella, especialmente en células con baja expresión de catepsinas (Shang *et al.* 2020). Adicionalmente, la catepsina L escinde también a la subunidad S2 en un sitio próximo a S2', generando así la estructura necesaria para la fusión entre la envoltura del virus y la membrana endosomial (Jackson *et al.* 2021; Takeda 2021).

La elección de la vía de entrada depende de la expresión de proteasas en la célula infectada. Si la célula expresa TMPRSS2, el SARS-CoV-2 utilizará preferentemente la fusión con la membrana citoplásmica y entrará sin endocitosis, mientras que si TMPRSS2 no se expresa, la única alternativa será la endocitosis, la escisión de S por catepsinas y la posterior fusión con la membrana endosomial (Evans y Liu 2021; Jackson *et al.* 2021). El principal mecanismo de la acción antiviral de la cloroquina y de su derivado hidroxicloroquina se sitúa a nivel endosomial (Savarino *et al.* 2003), y por ello cuando se ensayó su capacidad para bloquear *in vitro* la infección con SARS-CoV-2 usando células que no expresan TMPRSS2, como la línea VeroE6, tuvo éxito; pero posteriormente se demostró que en otras líneas celulares que si expresan TMPRSS2, como Calu-3 y Vero-TMPRSS2), la infección por SARS-CoV-2 ocurre en presencia de estos fármacos (Mykytyn *et al.* 2021; Scudellari 2021). El hecho de que la vía que utiliza furina y TMPRSS2 es la utilizada preferentemente en la infección del epitelio del tracto respiratorio inferior explica la escasa actividad anti-SARS-CoV-2 de la hidroxicloroquina *in vivo* (Jackson *et al.* 2021; Takeda 2021).

Adicionalmente, como se ha indicado al inicio de esta sección, algunos virus promueven la fusión célula-célula, lo que les permite pasar de una célula infectada a otra adyacente, sin salir al ambiente extracelular. Informes de autopsias de enfermos de COVID-19 han revelado la presencia de sincitios (células gigantes multinucleadas, formadas por la fusión de las membranas citoplásmicas de varias células) en el tejido pulmonar (Rajah *et al.* 2021). El paso de una célula a otra a través de la fusión célula-célula contribuye a la diseminación del virus evadiendo la respuesta de anticuerpos, además de constituir de por sí un efecto citopático (Papa *et al.* 2021; Rajah *et al.* 2021).

El proceso de fusión ente la membrana citoplásmica de una célula infectada por SARS-CoV-2 y la membrana de una célula adyacente sana es similar al de fusión entre la envoltura del virión y la membrana de la célula diana, y está mediado por el mismo péptido de fusión presente en la subunidad S2 de la proteína S (Rajah *et al.* 2021). La proteína S, igual que otras proteínas estructurales del virus, es transportada desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi (V'kovski *et al.* 2021). En la parte del Golgi más alejada del retículo endoplásmico (el trans-Golgi) ocurre la escisión mediada por la furina, tras la cual la proteína S debe regresar para acumularse en la red

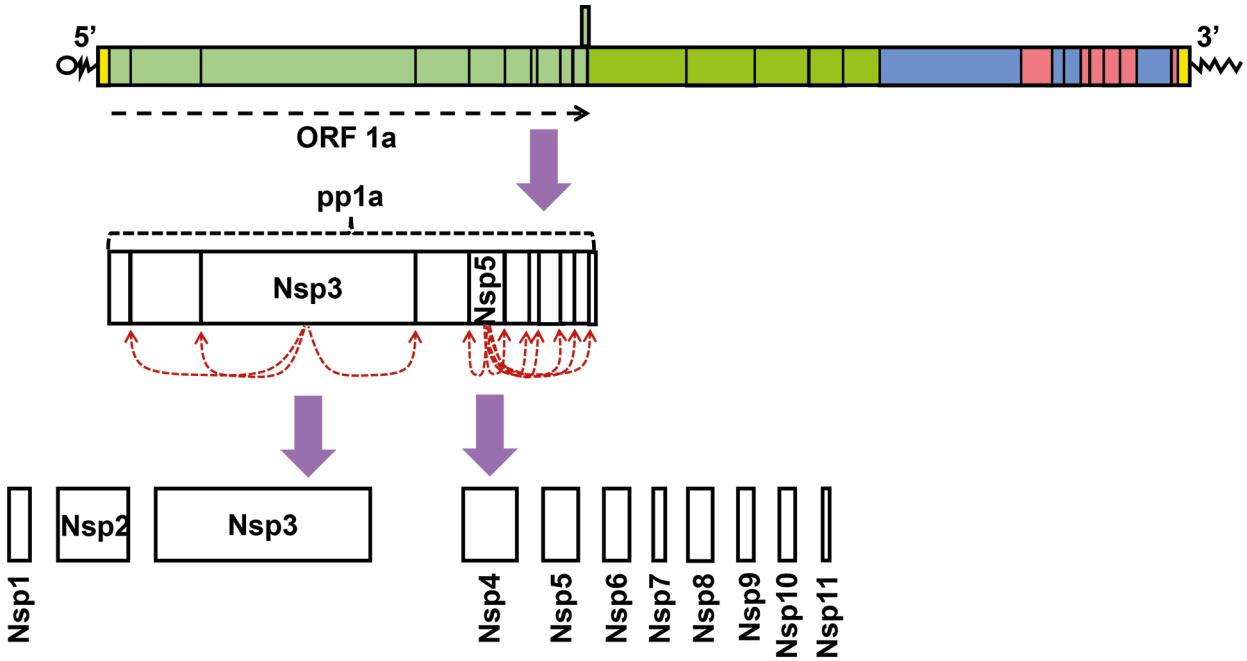


Figura 6. Traducción del ORF1a y procesamiento de la poliproteína pp1a. Las proteínas Nsp3 y Nsp5 son proteasas, que escinden a pp1a en sus 11 proteínas individuales. Cuando la traducción se extiende hasta el final del ORF1b, se produce la poliproteína pp1ab, que se escinde de forma similar por la acción de ambas proteasas (en este caso, no mostrado en la figura, Nsp5 es responsable de la separación desde Nsp4 hasta Nsp16)

de membranas intermedias entre Golgi y el retículo endoplásmico (Duan *et al.* 2020). La proteína S de SARS-CoV-2 posee sitios de unión para las proteínas celulares COP (*cytoplasmic coat protein*), tanto para COPI (responsable del transporte retrógrado de proteínas desde el complejo de Golgi hasta el retículo endoplásmico) como para COPII (que media el transporte anterógrado de proteínas, desde el retículo endoplásmico hasta el aparato de Golgi). La presencia de una histidina (en lugar de una lisina) en el residuo 1271, así como la treonina en el residuo 1273, debilitan la unión a COPI, que no es capaz de retener a toda la proteína S para llevarla de regreso al lugar donde se ensamblan los viriones (ver la sección 3.5), lo que facilita que parte de ella escape y migre hacia la membrana citoplásmica, donde podrá mediar la fusión con células vecinas (Cattin-Ortolá *et al.* 2021).

Además de la glicosilación, la proteína S sufre otras modificaciones postraslacionales, entre ellas la unión de ácidos grasos como el palmítico a cisteínas tanto en el extremo amino-terminal como en el carboxilo-terminal (palmitoilación); recientemente se ha demostrado que la palmitoilación no es necesaria para la localización de S en la membrana citoplásmica, pero sí es imprescindible para la fusión célula-célula (Li *et al.* 2021).

La escisión de S en sus dos subunidades es esencial para que ocurra la fusión célula-célula. Como se ha indicado, esta escisión ocurre en el trans-Golgi y está mediada por la furina, que corta el sitio multibásico de S, la cual llega ya escindida a la membrana celular. La eliminación del sitio multibásico impide por completo la fusión; sin embargo, ésta ocurre cuando ambas células carecen de furina, si bien los sincitios aparecen a un ritmo mucho más lento, lo cual sugiere que otras proteasas pueden catalizar también, aunque con menor eficiencia, la escisión en S1 y S2 (Papa *et al.* 2021).

3.3. Síntesis y procesamiento de las poliproteínas

Una vez que ha ocurrido la fusión entre la envoltura del virus y la membrana celular correspondiente, ya sea la citoplásmica o la endosomial, el RNA genómico se disocia de la proteína N (es decir, ocurre la descapsidación) y pasa al citoplasma de la célula hospedadora, donde adopta una serie de estructuras secundarias (horquillas configuradas por el apareamiento de repeticiones invertidas, sitios cuádruples y pseudonudos) que son esenciales para su replicación y transcripción (Kadam *et al.* 2021).

Cuando el genoma de un virus es RNA de polaridad positiva, es infeccioso de por sí, ya que al liberarse en el citoplasma puede actuar directamente como RNA mensajero y dirigir la síntesis de, por lo menos, algunas proteínas virales, iniciando así el proceso de infección que dará lugar a la progenie viral; en cambio, si el genoma es RNA de polaridad negativa no es infeccioso por sí solo, sino que necesita ir asociado a una RNA-polimerasa dependiente de RNA que lo tome como molde para transcribir los RNAs mensajeros, ya que esta clase de enzimas

no se encuentra en las células de los vertebrados. En el caso de los coronavirus, el RNA genómico se une a los ribosomas para traducir los dos primeros ORFs, lo que produce dos poliproteínas que son conglomerados de proteínas no estructurales. En el SARS-CoV-2, la traducción del ORF1a da lugar a la pp1a (fig. 6), mientras que si el marco de lectura se desplaza y la traducción se extiende al ORF1b se genera la pp1ab (ver la sección 2.3). Se ha determinado que el nivel de expresión de pp1a es de 1,4 a 2,2 veces mayor que el de pp1ab (Finkel *et al.* 2021). Ambas poliproteínas contienen las proteasas virales PLpro (Nsp3), que escinde las poliproteínas liberando a Nsp1, Nsp2 y a la propia Nsp3, y Mpro (Nsp5), que libera a Nsp4, Nsp5, Nsp6, Nsp7, Nsp8, Nsp9, Nsp10 y Nsp11 de pp1a y de pp1ab, y además a Nsp12, Nsp13, Nsp14, Nsp15 y Nsp16 de la pp1ab (ver sección 2.4.1). Las proteínas no estructurales son necesarias para la replicación y la transcripción del genoma viral.

3.4. Replicación y transcripción

En las células infectadas por virus con genoma RNA de polaridad positiva se produce una remodelación de las endomembranas para formar estructuras donde ocurre la replicación y la transcripción del genoma viral. Estas estructuras, denominadas «orgánulos de replicación», crean un entorno apropiado, donde se concentran las proteínas implicadas en la síntesis de los RNAs virales, se proporciona la topología adecuada a la maquinaria de replicación, se protege a los ARN virales de la degradación por enzimas celulares y se les oculta de la detección por sensores citosólicos que desencadenarían respuestas antivirales (Nagy *et al.* 2016). En las infecciones por coronavirus se generan tres tipos de estructuras de doble membrana que se derivan del retículo endoplásmico y se localizan alrededor del núcleo de la célula infectada: formaciones membranosas serpentiformes complejas (CM, de «*convoluted membranas*»), esférulas de doble membrana (DMS, de «*double-membrane spherules*») que tienen un tamaño de rango similar al de los viriones y están conectadas por CMs, y vesículas de doble membrana (DMV, mencionadas en la sección 2.4.1) sensiblemente mayores; en un estudio sobre MERS-CoV se obtuvieron promedios de diámetros de 80 nm para DMSs y 247 nm para DMVs (Snijder *et al.* 2020); en células infectadas por SARS-CoV-2 se han descrito DMVs con una separación de 18 nm entre ambas membranas y un diámetro interno promedio de 338 nm, dimensiones ligeramente superiores a las observadas con SARS-CoV (Klein *et al.* 2020). Las proteínas Nsp3, Nsp4 y Nsp6 del SARS-CoV-2 forman el complejo responsable de la generación de los orgánulos de replicación a partir del retículo endoplásmico (V'kovski *et al.* 2021). El complejo de replicación/transcripción (RTC) extendido, constituído por la RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp) Nsp12, sus cofactores Nsp7 y Nsp8, la helicasa Nsp13, la proteína de unión al RNA monocatenario Nsp9 y el RNA cebador (Yan *et al.* 2021), se asienta en los orgánulos de replicación, donde tiene lugar la síntesis de los RNAs genómicos y mensajeros (V'kovski *et al.* 2021). Probablemente, el complejo Nsp7-Nsp8 sintetiza al cebador y los transfiere a Nsp12 (Kadam *et al.* 2021). No hay que olvidar la participación de Nsp14, que mediante su dominio ExonN con actividad exonucleasa contribuye a la fidelidad de la replicación y, por ende, a la estabilidad del genoma, lo cual es importante genomas grandes (V'kovski *et al.* 2021). Otras proteínas virales como N y Nsp3 también están implicadas en el proceso de replicación/transcripción; recuérdese que la unión alternativa de la proteína N al dominio Ubl1 de Nsp3 o a secuencias reguladoras de la transcripción en el RNA podría decidir si se realiza la replicación o la transcripción, respectivamente (ver las funciones de Nsp3 descritas en la sección 2.4.1).

Obviamente, los RNAs que se sintetizan tomado como molde al RNA genómico de polaridad positiva tienen la polaridad complementaria, negativa; a su vez, serán tomados como moldes por la RdRp para la replicación (producción de genomas hijos) y la transcripción (producción de RNAs mensajeros, también denominados subgenómicos, ya que sus tamaños son inferiores al del genoma) (Finkel *et al.* 2021). La presencia simultánea de RNAs de polaridades complementarias hace que se formen transitoriamente RNAs bicatenarios, que han sido detectados en las DMVs, lo que sugiere que la síntesis de ARN viral ocurre dentro de las DMVs (V'kovski *et al.* 2021). Se ha observado que las DMVs poseen poros moleculares generados por Nsp3, que establece un paso desde el interior de las DMVs al citosol, lo que posiblemente facilite que los RNAs virales recién sintetizados estén disponibles para traducción en los ribosomas o la encapsidación en los viriones nacientes (Wolff *et al.* 2020).

La formación de los RNAs intermediarios, de polaridad negativa, ocurre de manera diferente según se trate de producir un molde o plantilla para la replicación o las diferentes plantillas para la transcripción de los RNAs subgenómicos. En el caso de la replicación, el RTC se fija en el extremo 3' del RNA genómico, que actúa como molde, e inicia la síntesis de la cadena complementaria, siempre en el sentido 5' → 3', y el proceso sigue a todo lo largo del genoma hasta llegar al extremo 5' del molde, lo que produce un RNA de polaridad negativa que abarca el genoma completo; este RNA se utilizará a su vez como plantilla para que el RTC sintetice los RNAs genómicos de la progenie viral, es decir, para la replicación del virus.

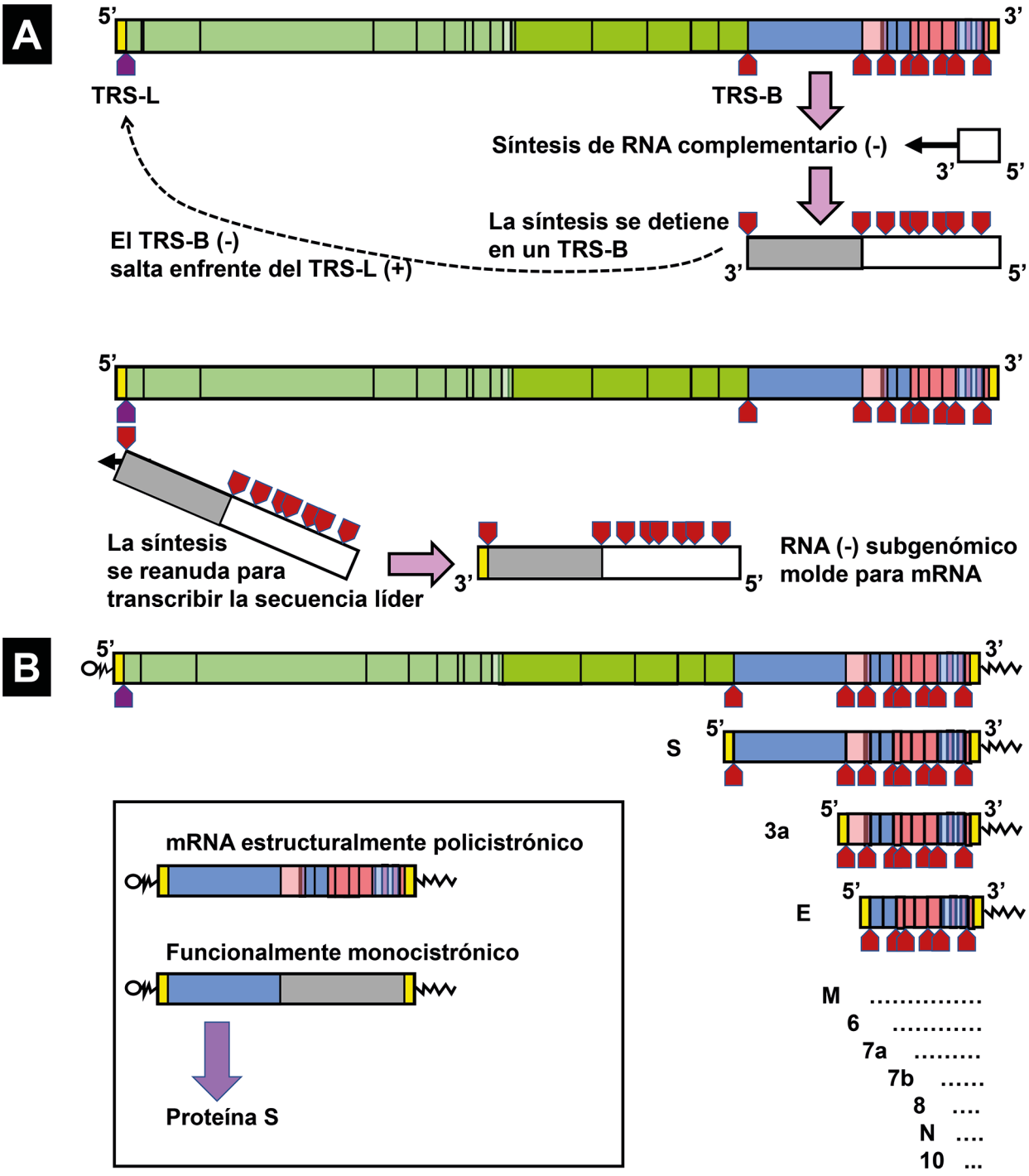


Figura 7. Transcripción discontinua en el SARS-CoV-2. A) formación de RNAs intermediarios subgenómicos que serán plantillas para los RNAs mensajeros (mRNAs); la RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp) inicia la síntesis de RNAs de sentido negativo tomando como molde el extremo 3' del genoma, pero la síntesis de las cadenas nacientes se detiene de forma escalonada en las diversas secuencias TRS-B («transcription regulatory sequence-B»), originando RNAs de distintos tamaños que comparten los extremos 5'; las secuencias TRS-B en los extremos 3' «saltan» para hibridar con la secuencia TRS-L para que se trascriba la secuencia líder. B) tomando como plantillas estos RNAs subgenómicos de polaridad negativa, la RdRp fabrica una serie de mRNAs de distintas longitudes, que aunque contengan varios genes, funcionalmente son monocistrónicos, ya que solo se traduce el que está junto al extremo 5'

Pero la formación de las plantillas para los RNAs mensajeros ocurre por un proceso típico de los coronavirus (y de otros miembros del orden *Nidovirales*), conocido como «transcripción viral discontinua» (fig. 7A), que genera una serie de moléculas de RNA (de polaridad negativa) anidadas (superpuestas) de distintos tamaños las cuales comparten entre ellas los extremos 3' y 5', que son las secuencias complementarias de los extremos 5' y 3'

del genoma (Sola *et al.* 2015). Recuérdese (sección 2.3) que en el genoma existen las secuencias reguladoras de la transcripción TRS-L (situada en la proximidad del extremo 5') y TRS-B (ubicadas en distintas posiciones a lo largo del genoma, delante de los ORFs). El RTC inicia la transcripción tomando como molde el genoma a partir de su extremo 3', es decir, sintetizando un RNA que se inicia en el extremo complementario 5' y que crece en sentido 5' → 3'; pero al llegar a alguno de los TRS-B, el RTC puede «saltar» hasta el TRS-L, omitiendo toda la parte del genoma que se encuentra entre ambos TRSs; la fusión del TRS-B donde ocurre el salto con el TRS-L da lugar, por tanto, a un RNA subgenómico de polaridad negativa (Sola *et al.* 2015; Fernandes *et al.* 2020; Ellis *et al.* 2021; V'kovski *et al.* 2021). Este procedimiento forma una diversidad de RNAs subgenómicos, que efectivamente comparten los extremos 5', ya el origen de la transcripción es común a todos ellos, y 3' porque una vez que el RTC ha saltado al TRS-L, transcribe la pequeña porción de nucleótidos (la secuencia líder) que va desde el TRS-L al extremo 5' del molde, que corresponde al 3' del RNA subgenómico (fig. 7B). Los RNAs subgenómicos de polaridad negativa así generados serán a su vez tomados como plantillas por los RTCs para producir RNAs mensajeros que se traducirán en las cuatro proteínas estructurales S, E, M y N, y en todas las proteínas accesorias. Una consecuencia de este proceso de transcripción es casi todos los RNAs mensajeros que así se forman (excepto el más corto, que contiene solo el transcrito de ORF10) son policistrónicos desde el punto de vista estructural, es decir, contienen más de un ORF; sin embargo, se piensa que funcionalmente son monocistrónicos y que de cada uno solo se traduce el ORF más próximo al extremo 5', que está ausente en los siguientes RNAs más pequeños (V'kovski *et al.* 2021).

La adquisición de la caperuza en el extremo 5' de los RNAs genómicos y subgenómicos es esencial para su protección, además de evitar su reconocimiento como RNAs extraños por sensores de la célula hospedadora y de promover el inicio de la traducción en los ribosomas, y debe realizarse conforme se inicia la síntesis del RNA naciente (recuérdese que la síntesis de los ácidos nucleicos va siempre en la dirección 5' → 3'). La formación de la caperuza en los RNAs de sentido positivo del SARS-CoV-2 ocurre en varias etapas (Ma *et al.* 2015; Romano *et al.* 2020; Giri *et al.* 2021; Kadam *et al.* 2021; Yan *et al.* 2021):

1. En el extremo 5' del RNA el primer nucleótido es un trifosfato de adenosina (al cual el RTC va uniendo los sucesivos nucleótidos a partir de nucleósidos-trifosfato, liberándose pirofosfato). Este RNA se representa como pppA-RNA. Mediante la acción de Nsp13 (que además de ser una helicasa posee actividad RNA 5'-trifosfatasa) se elimina un grupo fosfato de pppA-RNA para generar ppA-RNA.
2. A continuación, interviene Nsp12 con su dominio NiRAN, que a través de su actividad guanilil-transferasa hidroliza GTP y transfiere el producto GMP a ppA-RNA, con lo que se forma GpppA-RNA, es decir, un RNA que en su extremo 5' tiene los dos nucleósidos de bases púricas unidos por un puente trifosfato. Se piensa que otras proteínas no estructurales puedan intervenir en la arquitectura del complejo para una eficaz transferencia de GMP al extremo 5' del RNA naciente.
3. Seguidamente, entra en acción Nsp14, que mediante su dominio con actividad N7-metil-transferasa (activada por Nsp10) cataliza la metilación, en la posición N7, de la guanina incorporada al extremo 5' del RNA naciente, formando 7Me-GpppA-RNA. El metilo procede de la S-adenosil-metionina, que actúa como cofactor.
4. Por último, Nsp16 cataliza la metilación 2'-O de la ribosa del nucleótido de adenina, usando también S-adenosil-metionina como donador. Como en paso anterior, es necesaria la activación por Nsp10, que estabiliza la unión a la S-adenosil-metionina y facilita el acceso al RNA naciente. Las metilaciones estabilizan a la caperuza, impidiendo que se revierta la incorporación del nucleótido de guanina. El resultado es un RNA con caperuza, la cual se puede formular como 7Me-GpppA-2'OMe.

Al finalizar su síntesis los RNAs de polaridad positiva son poliadenilados. Los RNAs subgenómicos poseen en el extremo 5' la caperuza, seguida de la secuencia líder común a todos ellos, y las TRSs fusionadas seguidas de segmentos de diferentes longitudes que terminan todos ellos en el extremo 3' del genoma viral, al cual se une la cola de poliadenilato (Finkel *et al.* 2021).

Se ha estudiado la cinética de los RNAs virales en células en cultivo, observándose que entre las dos y las diez horas posinfección predomina la presencia de RNA subgenómico respecto del RNA genómico, alcanzándose un pico en la expansión del RNA subgenómico a las ocho horas; posteriormente, se incrementa la proporción de RNA genómico, que es el predominante a las 24 h; a las 32 h, comienzan a descender rápidamente estos niveles, como consecuencia de la salida de la progenie viral y de los efectos citotóxicos (Lee *et al.* 2022). Los altos niveles de RNA subgenómico se justifican teniendo en cuenta que un virión posee centenares de moléculas de proteínas, pero una sola de RNA genómico, por lo que la demanda de RNAs mensajeros es grande; cuando hay suficiente disponibilidad de proteínas estructurales es el momento en que se hacen necesarios los

RNAs genómicos para generar la progenie viral (Lee *et al.* 2022). Comparando los niveles de los distintos RNAs subgenómicos, se observa que aumentan conforme se va en dirección al extremo 3', consecuencia de la transcripción anidada anteriormente descrita (Finkel *et al.* 2021).

3.5. Ensamblaje y liberación de la progenie viral

Con el acrónimo ERGIC («*endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*») se designa al sistema de membranas tubulovesiculares que constituyen un compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y que cumple la función de dirigir las proteínas desde el retículo endoplásmico al cis-Golgi o, alternativamente, devolverlas al retículo endoplásmico. Una vez sintetizadas, las proteínas estructurales S, M y E ingresan en el retículo endoplásmico y son transportadas al ERGIC (Arya *et al.* 2021). La proteína S se sintetiza en el retículo endoplásmico como un precursor que posee en su extremo amino-terminal una secuencia señal que la dirige a la membrana del retículo endoplásmico, donde se inserta y, ya en forma de trímeros, es transportada a través del ERGIC al aparato de Golgi, en el cual es glicosilada (Duan *et al.* 2020); como ya se ha visto antes (sección 3.2.2), en el trans-Golgi ocurre la escisión en las subunidades S1 y S2, que sin embargo permanecen unidas, y parte de la proteína S migra hacia la superficie de la célula, mientras que el resto retrocede hasta el ERGIC. La proteína N, que se ha unido previamente a los RNAs genómicos (recién producidos en las DMVs) para formar complejos de ribonucleoproteína, designados como vRNP («viral ribonucleoprotein»), se une a la parte citosólica de los trímeros S que están insertados en la membrana y cuyos picos sobresalen hacia la luz del ERGIC (Klein *et al.* 2020). La presencia de las proteínas M y E, junto con la N, es necesaria para el ensamblaje de las partículas virales y para la curvatura de la membrana que terminará por envolverlas (Klein *et al.* 2020). Para ello, la proteína M debe ser ubiquitinada, lo que facilita la interacción de M con E para formar un complejo que promueve la maduración, gemación y liberación de los viriones hijos (Yuan *et al.* 2022). Se ha establecido que la enzima celular RNF5 («*ring finger protein 5*»), una ligasa de ubiquitina presente en la membrana del retículo endoplásmico, cataliza el proceso de ubiquitinación de M, mientras que una proteasa desubiquitinante del proteosoma, denominada POH1, podría regular negativamente la liberación de los viriones al catalizar la desubiquitinación de M; curiosamente, en las células infectadas por SARS-CoV-2 los niveles de RNF5 se incrementan mientras que los de POH1 disminuyen significativamente en comparación con los controles no infectados (Yuan *et al.* 2022). La escisión de las yemas virales, posiblemente promovida por la proteína E, libera a los viriones hijos en la luz del ERGIC; se forman vesículas que contienen una o más partículas virales, que son exportadas fuera de la célula (Bracquemond y Muriaux 2021). En un principio se asumió que las vesículas contenido coronavirus pasaban del ERGIC al aparato de Golgi siguiendo la vía secretora que los llevaría a salir por exocitosis (Kadam *et al.* 2021; V'kovski *et al.* 2021). Sin embargo, se han aportado evidencias de que en las células infectadas por *Betacoronavirus*, los viriones hijos viajan efectivamente desde el ERGIC hasta el trans-Golgi, pero una vez allí pasan a lisosomas exocíticos para su liberación, que ocurre por tanto por vía lisosomial en vez de por la vía de secreción por la que las células exportan las moléculas producto de biosíntesis (Ghosh *et al.* 2020). Este proceso interfiere con acidificación y la actividad enzimática de los lisosomas y con la presentación de antígenos (Ghosh *et al.* 2020; V'kovski *et al.* 2021). Observaciones más recientes sugieren que SARS-CoV-2 utiliza autofagosomas, inducidos por la proteína M, para la liberación de la progenie viral (Yuan *et al.* 2022). Como ya se comentó al tratar de la proteína Nsp6 (sección 2.4.1), la infección por coronavirus induce una respuesta celular de autofagosomas modificados; y la proteína Orf3a (sección 2.4.2) inhibe la fusión de los lisosomas con los autofagosomas, lo que preserva su contenido de la degradación. Por tanto, puede proponerse una secuencia de acontecimientos coordinados: inducción de autofagosomas por M, limitación de su tamaño por Nsp6 e inhibición de la fusión lisosomial por Orf3a; secuencia que sería aprovechada por SARS-CoV-2 para la liberación de su progenie.

En la figura 8 se presenta un esquema global del proceso de infección celular.

El virus entra en la célula por fusión con la membrana citoplásmica (lo que requiere la acción de TMPRSS2) o por endocitosis (en cuyo caso la fusión requiere catepsinas B y L, ver fig. 5). Tras la descapsidación, se traducen los ORFs 1a y 1ab del RNA genómico, produciendo las poliproteínas a partir de las cuales se generan las proteínas no estructurales (Nsp), entre ellas Nsp12, que es una RNA-polimerasa dependiente de RNA, y que, asociada a otras Nsp, forma el complejo de replicación y transcripción (RTC). La síntesis de los intermediarios de replicación y de los distintos mRNAs (RNAs subgenómicos, ver fig. 7) y de las copias de RNA genómico, mediada por el RTC, ocurre en vesículas de doble membrana derivadas del retículo endoplásmico (ER). La traducción de los mRNAs produce las proteínas estructurales S, M, E y N y las proteínas accesorias (Orf3a a Orf10, no mostradas en la figura, que intervienen en las interacciones del virus con las defensas celulares y la inmunidad). El ensamblaje de los viriones hijos ocurre en el compartimento

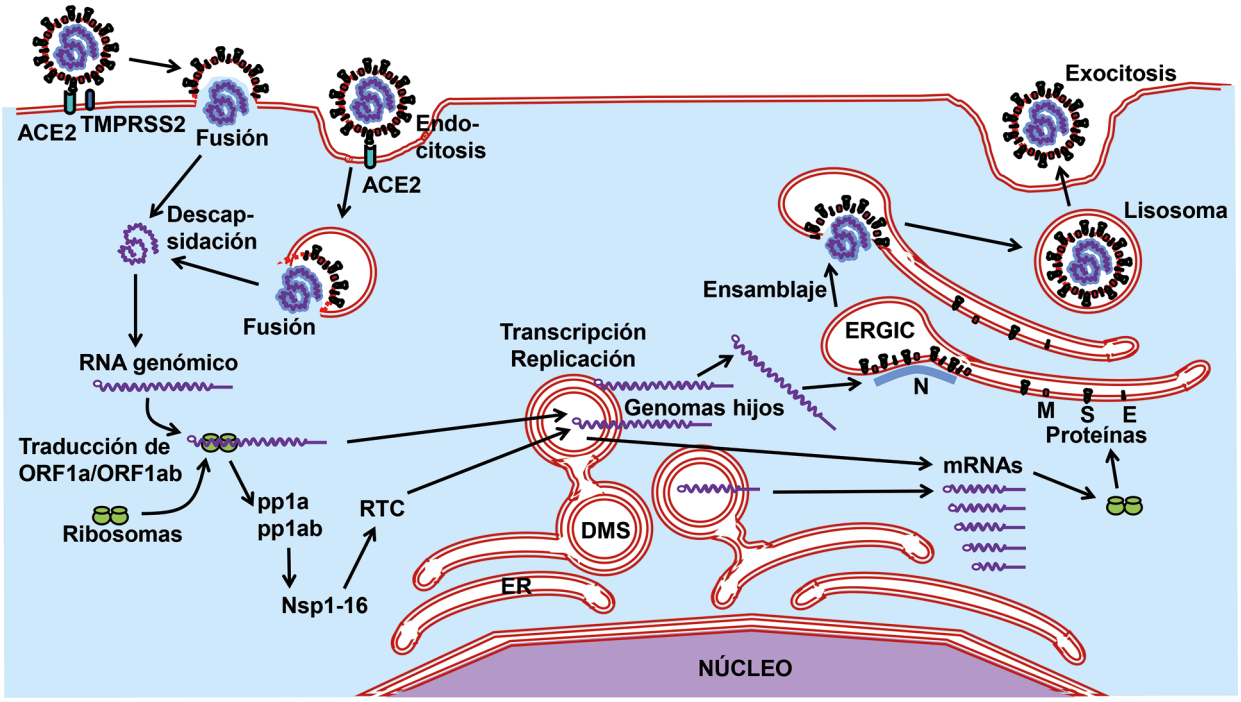


Figura 8. Esquema de la infección celular por SARS-CoV-2

intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (ERGIC), desde cuya luz pasan al trans-Golgi para incorporarse a lisosomas exocíticos que liberan a la progenie viral.

4. IMPLICACIONES DE LA BIOLOGÍA DEL SARS-COV-2 EN LA PATOGÉNESIS

Las manifestaciones patológicas de las infecciones virales pueden ser directas, si son resultado de la actividad biológica del virus (lo que incluye los efectos citopáticos) o indirectas si ocurren como consecuencia de los mecanismos defensivos (tanto de la inmunidad innata como de la específica) que la presencia del virus activa en el hospedador.

La COVID-19 tiene manifestaciones clínicas heterogéneas. Es posible agrupar a los enfermos en cinco categorías: asintomático, leve, moderado, grave y crítico (Pollard *et al.* 2020). En los casos leves hay síntomas agudos de infección del tracto respiratorio, que pueden acompañarse de complicaciones digestivas; los pacientes moderados presentan neumonía, que en los pacientes graves cursa con hipoxemia, mientras que los pacientes críticos experimentan el típico síndrome de dificultad respiratoria aguda junto con posible shock, coagulación intravascular y fallo multiorgánico. Un componente crucial de estas manifestaciones es la respuesta inflamatoria, que alcanza su mayor gravedad con la llamada «tormenta de citocinas» (liberación masiva de citocinas proinflamatorias). Se trata, por tanto, de mecanismos de patogénesis indirecta, de los que no nos ocuparemos en este capítulo, que se centra en la biología del virus.

En cambio, sí procede considera aquí la patogénesis directa por SARS-CoV-2, que se centra en dos aspectos: los efectos citopáticos y la acción sobre el receptor celular ACE2.

Las alteraciones estructurales causadas por SARS-CoV-2 han sido estudiadas en cultivos celulares infectados *in vitro*, lo que obviamente conlleva algunas limitaciones al extrapolar estas observaciones a la infección natural. En células Vero, un seguimiento seriado reveló lo siguiente: a las 4 horas posinfección no hay diferencias perceptibles entre células infectadas y no infectadas; a las 6 horas se forman grupos discretos de vesículas de una sola membrana en el citoplasma y laminillas anulares (pilas de membranas derivadas del retículo endoplásmico dispuestas en paralelo y que contienen complejos de poros nucleares); a las 8 horas aparecen cambios masivos: numerosas DMVs, frecuentemente rodeada por mitocondrias, y las primeras partículas virales ensambladas dentro de vesículas intracelulares (probablemente relacionadas con el ERGIC); a las 10 y 12 horas ya hay gran número de viriones extracelulares en la superficie celular, con imágenes de vesículas portadoras de una o más partículas virales que se dirigen hacia la membrana plasmática y se fusionan con ella; a las 24 horas los virus aún eran detectables en las superficies celulares (Eymieux *et al.* 2021). Un hallazgo interesante fue la presencia de vacuolas de gran tamaño conteniendo partículas virales carentes de los típicos picos de la proteína S

y de aspecto diferente al de los viriones acumulados en la superficie celular: los autores especulan que estas vacuolas pudieran proceder de autofagosomas en los que hubiese ocurrido la fusión lisosomial, con consecuencias de degradación de las partículas virales englobadas, o bien el resultado de ensamblajes defectuosos que hubiese producido partículas virales inmaduras no infectivas (Eymieux *et al.* 2021).

Una aproximación interesante a las condiciones naturales es el uso de cultivos organotípicos de células epiteliales de las vías respiratorias humanas bien diferenciadas, formando una capa epitelial pseudoestratificada que imita morfológica y funcionalmente a la mucosa de las vías respiratorias humanas, con células basales, células ciliadas (con movimiento ciliar) y células secretoras de moco. Utilizando este modelo, el máximo de producción de viriones se alcanzó entre las 48 y las 72 h posinfección y permaneció hasta seis días; un efecto citopático característico fue la formación de placas en la superficie de los cultivos, observables con el microscopio lumínico, que contienen sincitios resultantes de la fusión de células (en la sección 3.2.2 se comenta el mecanismo molecular de esta fusión), acompañada del encogimiento de los cilios y la pérdida de la integridad del epitelio por destrucción de las uniones fuertes intercelulares; además, las células infectadas presentan numerosas DMVs, así como cuerpos de inclusión de diversos tipos, algunos llenos de partículas virales; finalmente, aparecen numerosas células apoptóticas, pero apenas se detecta necrosis (Zhu *et al.* 2020).

En lo que se refiere a los efectos de la unión del virus a su receptor ACE2 (ver sección 3.1), se asume que ACE2 queda bloqueada, lo que impide el acceso de su sustrato la angiotensina II; este bloqueo finalmente produce un aumento de la vasoconstricción mediada por angiotensina II y una disminución de la vasodilatación mediada por angiotensina (1-7) (Beyerstedt *et al.* 2021). Esta explicación concuerda con lo expuesto en la sección 3.1 sobre el papel de ACE2 como regulador clave del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Otras explicaciones proponen que, más que una competición entre el virus y la angiotensina II por el receptor ACE2, lo que sucede es que la entrada del virus unido a su receptor tiene como consecuencia la degradación de ACE2 (Pollard *et al.* 2020), de forma similar a lo descrito para el SARS-CoV (Haga *et al.* 2008). Sea cual fuere el mecanismo de la pérdida de función de ACE2, las posibles implicaciones en la patología de la COVID-19 parecen ser muchas: contribución a la respuesta inmunitaria inflamatoria y la tormenta de citocinas, con el consiguiente daño en el tejido pulmonar (Pollard *et al.* 2020; Siri *et al.* 2021); a la fibrosis endotelial e intersticial y a la hipertrofia miocárdica (Pollard *et al.* 2020); a la inflamación del tejido adiposo epicárdico y, en última instancia, a las complicaciones cardíacas (Beyerstedt *et al.* 2021); también, a complicaciones gastrointestinales (Siri *et al.* 2021). Sin embargo, hay algunas discrepancias al respecto, ya que en el caso concreto de las complicaciones cardíacas, los exámenes anatomopatológicos en personas fallecidas por COVID-19 no han sido capaces de evidenciar de forma concluyente la pérdida de ACE2, lo que plantea interrogantes sobre el mecanismo real de dichas complicaciones (Zhang *et al.* 2021).

Por último, hay que tener presente que tanto las variaciones en la proteína S, debidas a mutaciones en las distintas variantes del virus, como los polimorfismos en el gen que codifica para ACE2 pueden afectar a la afinidad de unión y a sus consecuencias patogénicas.

BIBLIOGRAFÍA

ALHAMMAD, Y.M.O, KASHIPATHY, M.M., ROY, A., ..., POIRIER, G.G., LOVELL, S. & FEHR, A.R. (2021), The SARS-CoV-2 Conserved Macrodomain Is a Mono-ADP-Ribosylhydrolase. Journal of Virology 95(3): e01969-20.

ALHAMMAD, Y.M., PARTHASARATHY, S., GHIMIRE, R., ..., ENJUANES, L., MORE, S., CHANNAPPANAVAR, R. & FEHR, A.R. (2023), SARS-CoV-2 Mac1 Is Required for IFN Antagonism and Efficient Virus Replication in Cell Culture and in Mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 120(35): e2302083120.

ALSAADI, E.A.J. & JONES, I.M. (2019), Membrane Binding Proteins of Coronaviruses. Future Virology 14(4): 275-286.

ARDUINI, A., LAPRISE, F. & LIANG, C. (2023), SARS-CoV-2 ORF8: A Rapidly Evolving Immune and Viral Modulator in COVID-19. Viruses 15(4): 871.

ARYA, R., KUMARI, S., PANDEY, B., ..., GUPTA, G.D., PANICKER, L. & KUMAR, M. (2021), Structural Insights into SARS-CoV-2 Proteins. Journal of Molecular Biology 433(2): 166725.

ASHRAF, U.M., ABOKOR, A.A., EDWARDS, J.M., ..., HARDY, A.M.G., CHAKRAVARTI, R. & KOCH, L.G. (2021), SARS-CoV-2, ACE2 Expression, and Systemic Organ Invasion. Physiological Genomics 53(2): 51-60.

BAR-ON, Y.M., FLAMHOLZ, A., PHILLIPS, R. & MILO, R. (2020), SARS-CoV-2 (COVID-19) by the Numbers. eLife 9: e57309.

BELLO-PEREZ, M., HURTADO-TAMAYO, J., MYKYTYN, A.Z., ..., ENJUANES, L., HAAGMANS, B.L. & SOLA, I. (2023), SARS-CoV-2 ORF8 Accessory Protein Is a Virulence Factor. mBio 14(5): e0045123.

BEYERSTEDT, S., CASARO, E.B. & RANGEL, É.B. (2021), COVID-19: Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2)

Expression and Tissue Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 40(5): 905-919.

BRACQUEMOND, D. & MURIAUX, D. (2021), Betacoronavirus Assembly: Clues and Perspectives for Elucidating SARS-CoV-2 Particle Formation and Egress. mBio 12(5): e0237121.

CAMPILLO-BALDERAS, J.A., LAZCANO, A. & BECERRA, A. (2015), Viral Genome Size Distribution Does Not Correlate with the Antiquity of the Host Lineages. Frontiers in Ecology and Evolution 3: 143.

CANTUTI-CASTELVETRI, L., OJHA, R., PEDRO, L.D., ..., STADELMANN, C., BALISTRERI, G. & SIMONS, M. (2020), Neuropilin-1 Facilitates SARS-CoV-2 Cell Entry and Infectivity. Science 370(6518): 856-860.

CAO, Y., YANG, R., LEE, I., ZHANG, W., SUN, J., WANG, W. & MENG, X. (2021), Characterization of the SARS-CoV-2 E Protein: Sequence, Structure, Viroporin, and Inhibitors. Protein Science 30(6): 1114-1130.

CATTIN-ORTOLÁ, J., WELCH, L.G., MASLEN, S.L., PAPA, G., JAMES, L.C. & MUNRO, S. (2021), Sequences in the Cytoplasmic Tail of SARS-CoV-2 Spike Facilitate Expression at the Cell Surface and Syncytia Formation. Nature Communications 12(1): 5333.

CHEN, J., MALONE, B., LLEWELLYN, E., ..., KAPOOR, T.M., DARST, S.A. & CAMPBELL, E.A. (2020), Structural Basis for Helicase-Polymerase Coupling in the SARS-CoV-2 Replication-Transcription Complex. Cell 182(6): 1560-1573.e13.

CONG, Y., ULASLI, M., SCHEPERS, H., ..., KRIEGENBURG, F., THIEL, V. & DE HAAN, C.A.M., REGGIORI F. (2020), Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. Journal of Virology 94(4): e01925-19.

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (2020), The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-nCoV and Naming It SARS-CoV-2. Nature Microbiology 5(4): 536-544.

COTTAM, E.M., WHELBAND, M.C. & WILEMAN, T. (2014), Coronavirus NSP6 Restricts Autophagosome Expansion. Autophagy 10(8): 1426-1441.

DALY, J.L., SIMONETTI, B., KLEIN, K., ..., COLLINS, B.M., CULLEN, P.J. & YAMAUCHI, Y. (2020), Neuropilin-1 Is a Host Factor for SARS-CoV-2 infection. Science 370(6518): 861-865.

DESAI, T.J., BROWNFIELD, D.G. & KRASNOW, M.A. (2014), Alveolar Progenitor and Stem Cells in Lung Development, Renewal and Cancer. Nature 507(7491): 190-194.

DI, D., DILEEPAN, M., AHMED, S., LIANG, Y. & LY, H. (2021), Recombinant SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein: Expression, Purification, and Its Biochemical Characterization and Utility in Serological Assay Development to Assess Immunological Responses to SARS-CoV-2 Infection. Pathogens 10(8): 1039.

DUAN, L., ZHENG, Q., ZHANG, H., NIU, Y., LOU, Y. & WANG, H. (2020), The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. Frontiers in Immunology 11: 576622.

ECKERLE, L.D., LU, X., SPERRY, S.M., CHOI, L. & DENISON, M.R. (2007), High Fidelity of Murine Hepatitis Virus Replication Is Decreased in nsp14 Exoribonuclease Mutants. Journal of Virology 81(22): 12135-12144.

ELLIS, P., SOMOGYVÁRI, F., VIROK, D.P., NOSEDA, M. & MCLEAN, G. R. (2021), Decoding COVID-19 with the SARS-CoV-2 Genome. Current Genetic Medicine Reports 9(1): 1-12.

EVANS, J.P. & LIU, S.L. (2021), Role of Host Factors in SARS-CoV-2 Entry. Journal of Biological Chemistry 297(1): 100847.

EYMIEUX, S., ROUILLÉ, Y., TERRIER, O., ..., DUBUISSON, J., BELOUZARD, S. & ROINGEARD, P. (2021), Ultrastructural Modifications Induced by SARS-CoV-2 in Vero Cells: A Kinetic Analysis of Viral Factory Formation, Viral Particle Morphogenesis and Virion Release. Cellular and Molecular Life Sciences 78(7): 3565-3576.

FERNANDES, J.D., HINRICHS, A.S., CLAWSON, H., ..., KENT, W.J., HAUSSLER, D. & HAEUSSLER, M. (2020), The UCSC SARS-CoV-2 Genome Browser. Nature Genetics 52(10): 991-998.

FINKEL, Y., MIZRAHI, O., NACHSHON, A., ..., PARAN, N., SCHWARTZ, M. & STERN-GINOSSAR, N. (2021), The Coding Capacity of SARS-CoV-2. Nature 589(7840): 125-130.

FRICK, D.N., VIRDI, R.S., VUKSANOVIC, N., DAHAL, N. & SILVAGGI, N.R. (2020), Molecular Basis for ADP-Ribose Binding to the Mac1 Domain of SARS-CoV-2 nsp3. Biochemistry 59(28): 2608-2615.

GADHAVE, K., KUMAR, P., KUMAR, A., BHARDWAJ, T., GARG, N. & GIRI, R. (2021), Conformational Dynamics of 13 Amino Acids Long NSP11 of SARS-CoV-2 under Membrane Mimetics and Different Solvent Conditions. Microbial Pathogenesis 158: 105041.

GARCÍA-NICOLÁS, O., V'KOVSKI, P., ZETTL, F., ZIMMER, G., THIEL, V. & SUMMERFIELD, A. (2021), No Evidence for Human Monocyte-Derived Macrophage Infection and Antibody-Mediated Enhancement of SARS-CoV-2 Infection. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 11: 644574.

GHOSH, S., DELLIBOVI-RAGHEB, T.A., KERVIEL, A., ..., KEHRL, J., ALTAN-BONNET, G. & ALTAN-BONNET, N. (2020), β-Coronaviruses Use Lysosomes for Egress Instead of the Biosynthetic Secretory Pathway. Cell 183(6): 1520-1535.e14.

GIRI, R., BHARDWAJ, T., SHEGANE, M., ..., GADHAVE, K., OLDFIELD, C.J. & UVERSKY, V.N. (2021), Understanding COVID-19 Via Comparative Analysis of Dark Proteomes of SARS-CoV-2, Human SARS and Bat SARS-Like Coronaviruses. Cellular and Molecular Life Sciences 78(4): 1655-1688.

GONG, Y., QIN, S., DAI, L. & TIAN, Z. (2021), The Glycosylation in SARS-CoV-2 and Its Receptor ACE2. Signal Transduction and Targeted Therapy 6(1): 396.

GONZÁLEZ, J.M., GOMEZ-PUERTAS, P., CAVANAGH, D., GORBALENYA, A.E. & ENJUANES, L. (2003), A Comparative Sequence Analysis to Revise the Current Taxonomy of the Family Coronaviridae. Archives of Virology 148(11): 2207-2235.

GRAHAM, R.L., DONALDSON, E.F. & BARIC, R.S. (2013), A Decade after SARS: Strategies for Controlling Emerging Coronaviruses. Nature Reviews Microbiology 11(12): 836-848.

GU, Y., CAO, J., ZHANG, X., ..., XIE, Y., LUO, M. & LU, Z. (2022), Receptome Profiling Identifies KREMEN1 and ASGR1 as Alternative Functional Receptors of SARS-CoV-2. Cell Research 32: 24-37.

HAGA, S., YAMAMOTO, N., NAKAI-MURAKAMI, C., ..., YAMAMOTO, N., SASAZUKI, T. & ISHIZAKA, Y. (2008), Modulation of TNF-Alpha-Converting Enzyme by the Spike Protein of SARS-CoV and ACE2 Induces TNF-Alpha Production and Facilitates Viral Entry. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(22): 7809-7814.

HALTOM, J., TROVAO, N.S., GUARNIERI, J., ..., BEHESHTI, A., SCHWARTZ, R. & WURTELE, E.S. (2023), SARS-CoV-2 Orphan Gene ORF10 Contributes to More Severe COVID-19 Disease. MedRxiv [Preprint]. 2023.11.27.23298847.

HIKMET, F., MÉAR, L., EDVINSSON, Å., MICKE, P., UHLÉN, M. & LINDSKOG, C. (2020), The Protein Expression Profile of ACE2 in Human Tissues. Molecular Systems Biology 16(7): e9610.

HOFFMANN, M., KLEINE-WEBER, H., SCHROEDER, S., ..., MÜLLER, M.A., DROSTEN, C. & PÖHLMANN, S. (2020), SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell 181(2): 271-280.e8.

HUANG, Y., YANG, C., XU, X.F., XU, W. & LIU, S.W. (2020), Structural and Functional Properties of SARS-CoV-2 Spike Protein: Potential Antivirus Drug Development for COVID-19. Acta Pharmacologica Sinica 41(9): 1141-1149.

HUI, X., ZHANG, L., CAO, L., ..., LIN, X., CHEN, M. & JIN, M. (2021), SARS-CoV-2 Promote Autophagy to Suppress Type I Interferon Response. Signal Transduction and Targeted Therapy 6(1): 180.

HURTADO-TAMAYO, J., REQUENA-PLATEK, R., ENJUANES, L., BELLO-PEREZ, M. & SOLA, I. (2023), Contribution to Pathogenesis of Accessory Proteins of Deadly Human Coronaviruses. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 13: 1166839.

HUSTON, N.C., WAN, H., STRINE, M.S., DE CESARIS ARAUJO TAVARES, R., WILEN C.B. & PYLE, A.M. (2021), Comprehensive In Vivo Secondary Structure of the SARS-CoV-2 Genome Reveals Novel Regulatory Motifs and Mechanisms. Molecular Cell 81(3): 584-598.e5.

JACKSON, CB., FARZAN, M., CHEN, B. & CHOE, H. (2021), Mechanisms of SARS-CoV-2 Entry into Cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology 5: 1-18.

JIA, H.P., LOOK, D.C., SHI, L., ..., WOHLFORD-LENANE, C., PERLMAN, S. & MCCRAY, P.B. Jr. (2005), ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. Journal of Virology 79(23): 14614-14621.

KADAM, S.B., SUKHRAMANI, G.S., BISHNOI, P., PABLE, A.A. & BARVKAR, V.T. (2021), SARS-CoV-2, the Pandemic Coronavirus: Molecular and Structural Insights. J Basic Microbiology 61(3): 180-202.

KE, Z., OTON, J., QU, K., ..., SCHERES, S.H.W., BARTENSCHLAGER, R. & BRIGGS, J.A.G. (2020), Structures and Distributions of SARS-CoV-2 Spike Proteins on Intact Virions. Nature 588(7838): 498-502.

KHAVINSON, V., TEREKHOV, A., KORMILETS, D. & MARYANOVICH, A. (2021), Homology between SARS CoV-2 and Human Proteins. Scientific Reports 11(1): 17199.

KLEIN, S., CORTESE, M., WINTER, S.L., ..., BOULANT, S., BARTENSCHLAGER, R. & CHLANDA, P. (2020), SARS-CoV-2 Structure and Replication Characterized by In Situ Cryo-Electron Tomography. Nature Communications 11(1): 5885.

KOLESNIKOVA, S. & CURTIS, E.A. (2019), Structure and Function of Multimeric G-Quadruplexes. Molecules 24(17): 3074.

KOOI, C., CERVIN, M. & ANDERSON, R. (1991), Differentiation of Acid-pH-Dependent and Non-Dependent Entry Pathways for Mouse Hepatitis Virus. Virology 180(1): 108-119.

LAUE, M., KAUTER, A., HOFFMANN, T., MÖLLER, L., MICHEL, J. & NITSCHE, A. (2021), Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Particles in Ultrathin Plastic Sections of Infected Vero Cell Cultures. Scientific Reports 11(1): 3515.

LAVIGNE, M., HELYNCK, O., RIGOLET, P., ..., ENGLAND, P., MERGNY, J.L. & MUNIER-LEHMANN, H. (2021), SARS-CoV-2 Nsp3 Unique Domain SUD Interacts with Guanine Quadruplexes and G4-Ligands Inhibit this Interaction. Nucleic Acids Research 49(13): 7695-7712.

LEE, J.Y., WING, P.A., GALA, D.S., ..., CASTELLO, A., MCKEATING, J.A. & DAVIS, I. (2022), Absolute Quantitation of Individual SARS-CoV-2 RNA Molecules Provides a New Paradigm for Infection Dynamics and Variant Differences. eLife 21: e74153.

LEI, J., KUSOV, Y. & HILGENFELD, R. (2018), Nsp3 of Coronaviruses: Structures and Functions of a Large Multi-Domain Protein. Antiviral Research 149: 58-74.

LEVINE, B. (2005), Eating Oneself and Uninvited Guests: Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense. Cell 120(2): 159-162.

LI, D., LIU, Y., LU, Y., GAO, S. & ZHANG, L. (2022), Palmitoylation of SARS-CoV-2 S Protein Is Critical for S-Mediated Syncytia Formation and Virus Entry. Journal of Medical Virology 94(1): 342-348.

LIU, Y., QU, H.Q., QU, J., TIAN, L. & HAKONARSON, H. (2020), Expression Pattern of the SARS-CoV-2 Entry Genes ACE2 and TMPRSS2 in the Respiratory Tract. Viruses 12(10): 1174.

LU, R., ZHAO, X., LI, J., ..., CHEN, W., SHI, W. & TAN, W. (2020), Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. The Lancet 395(10224): 565-574.

LUKASSEN, S., CHUA, R.L., TREFZER, T., ..., KREUTER, M., CONRAD, C. & EILS, R. (2020), SARS-CoV-2 Receptor ACE2 and TMPRSS2 Are Primarily Expressed in Bronchial Transient Secretory Cells. EMBO Journal 39(10): e105114.

MA, Y., WU, L., SHAW, N., ..., YAN, L., ZHANG, R. & RAO, Z. (2015), Structural Basis and Functional Analysis of the SARS Coronavirus nsp14-nsp10 Complex. Proceedings of the National Academy of Sciences 112(30): 9436-9441.

MARIANO, G., FARTHING, R.J., LALE-FARJAT, S.L.M. & BERGERON, J.R.C. (2020), Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need To Be. Frontiers in Molecular Biosciences 7: 605236.

MIAO, G., ZHAO, H., LI, Y., ..., BI, Y., WANG, P. & ZHANG, H. (2021), ORF3a of the COVID-19 Virus SARS-CoV-2 Blocks HOPS Complex-Mediated Assembly of the SNARE Complex Required for Autolysosome Formation. Developmental Cell 56(4): 427-442.e5.

MICHEL, C.J., MAYER, C., POCH, O. & THOMPSON, J.D. (2020), Characterization of Accessory Genes in Coronavirus Genomes. Virology Journal 17(1): 131.

MOUSTAQIL, M., OLLIVIER, E., CHIU, H.P., ..., LEE, B., SIERECKI, E. & GAMBIN, Y. (2021), SARS-CoV-2 Proteases PLpro and 3CLpro Cleave IRF3 and Critical Modulators of Inflammatory Pathways (NLRP12 and TAB1): Implications for Disease Presentation across Species. Emerging Microbes Infectious 10(1): 178-195.

MYKYTYN, A.Z., BREUGEN, T.I., RIESEBOSCH, S., ..., ROTTIER, R.J., LAMERS, M.M. & HAAGMANS, B.L. (2021), SARS-CoV-2 Entry into Human Airway Organoids Is Serine Protease-Mediated and Facilitated by the Multibasic Cleavage Site. eLife 10: e64508.

NAGY, P.D., STRATING, J.R. & VAN KUPPEVELD, F.J. (2016), Building Viral Replication Organelles: Close Encounters of the Membrane Types. PLoS Pathogens 12(10): e1005912.

NAHALKA, J. (2021), Theoretical Analysis of S, M and N Structural Proteins by the Protein-RNA Recognition Code Leads to Genes/Proteins that Are Relevant to the SARS-CoV-2 Life Cycle and Pathogenesis. Frontiers in Genetics 12: 763995.

NAQVI, A.A.T., FATIMA, K., MOHAMMAD, T., ..., HARIPRASAD, G., HASAN, G.M. & HASSAN, M.I. (2020), Insights into SARS-CoV-2 Genome, Structure, Evolution, Pathogenesis and Therapies: Structural Genomics Approach. Biochimica Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease 1866(10): 165878.

NIETO-TORRES, J.L., VERDIÁ-BÁGUENA, C., CASTAÑO-RODRIGUEZ, C., AGUILELLA, V.M. & ENJUANES, L. (2015), Relevance of Viroporin Ion Channel Activity on Viral Replication and Pathogenesis. Viruses 7(7): 3552-3573.

OSIPIUK, J., AZIZI, S.A., DVORKIN, S., ..., SNYDER, S.A., DICKINSON, B.C. & JOACHIMIAK, A. (2021), Structure of Papain-Like Protease from SARS-CoV-2 and Its Complexes with Non-Covalent Inhibitors. Nature Communications 12(1): 743.

PAPA, G., MALLERY, D.L., ALBECKA, A., ..., CARTER, A., MUNRO, S. & JAMES, L.C. (2021), Furin Cleavage of SARS-CoV-2 Spike Promotes but Is Not Essential for Infection and Cell-Cell Fusion. PLoS Pathogens 17(1): e1009246.

POLLARD, C.A., MORRAN, M.P. & NESTOR-KALINOSKI, A.L. *et al.* (2020), The COVID-19 Pandemic: A Global Health Crisis. Physiological Genomics 52(11): 549-557.

RAHIMI, A., MIRZAZADEH, A. & TAVAKOLPOUR, S. (2021), Genetics and Genomics of SARS-CoV-2: A Review of the Literature with the Special Focus on Genetic Diversity and SARS-CoV-2 Genome Detection. Genomics 113(1 Pt 2): 1221-1232.

RAJAH, M.M., BERNIER, A., BUCHRIESER, J. & SCHWARTZ, O. (2021), The Mechanism and Consequences of SARS-CoV-2 Spike-Mediated Fusion

and Syncytia Formation. Journal of Molecular Biology 434(6): 167280.

REDONDO, N., ZALDÍVAR-LÓPEZ, S., GARRIDO, J.J. & MONTOYA, M. (2021), SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. Frontiers in Immunology 12: 708264.

ROCK, J.R. & HOGAN, B.L. (2011), Epithelial Progenitor Cells in Lung Development, Maintenance, Repair, and Disease. Annual Review of Cell and Developmental Biology 27: 493-512.

ROMANO, M., RUGGIERO, A., SQUEGLIA, F., MAGA, G. & BERISIO, R. (2020), A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. Cells 9(5): 1267.

RUIZ-BRAVO, A. & JIMÉNEZ-VALERA, M. (2020), SARS-CoV-2 y pandemia de síndrome respiratorio agudo (COVID-19). Ars Pharmaceutica 61(2): 63-79.

RUT, W., LV, Z., ZMUDZINSKI, M., ..., BEKES, M., DRAG, M. & OLSEN, S.K. (2020), Activity Profiling and Crystal Structures of Inhibitor-Bound SARS-CoV-2 Papain-Like Protease: A Framework for Anti-COVID-19 Drug Design. Science Advances 6(42): eabd4596.

SANDERS, B., POHKREL, S., LABBE, A., ..., GALANIE, S., HEAD, M. & PARKS, J. (2021), Potent and Selective Covalent Inhibitors of the Papain-Like Protease from SARS-CoV-2. Res Sq [Preprint]. 2021:rs.3.rs-906621.

SATARKER, S. & NAMPOOTHIRI, M. (2020), Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. Archives of Medical Research 51(6): 482-491.

SAVARINO, A., BOELAERT, J.R., CASSONE, A., MAJORI, G. & CAUDA, R. (2003), Effects of Chloroquine on Viral Infections: An Old Drug against Today's Diseases? The Lancet Infectious Diseases 3(11): 722-727.

SCHUBERT, K., KAROUSIS, E.D., JOMAA, A., ..., THIEL, V., MÜHLEMANN, O. & BAN, N. (2020), SARS-CoV-2 Nsp1 Binds the Ribosomal mRNA Channel to Inhibit Translation. Nature Structural and Molecular Biology 27(10): 959-966.

SCUDELLARI, M. (2021), How the Coronavirus Infects Cells. Nature 595(7869): 640-644.

SHANG, J., WAN, Y., LUO, C., YE, G., GENG, Q., AUERBACH, A. & LI, F. (2020), Cell Entry Mechanisms of SARS-CoV-2. Proceedings of the National Academy of Sciences 117(21): 11727-11734.

SHIN, D., MUKHERJEE, R., GREWE, D., ..., HUMMER, G., CIESEK, S. & DIKIC, I. (2020), Papain-Like Protease Regulates SARS-CoV-2 Viral Spread and Innate Immunity. Nature. 587(7835): 657-662.

SIRI, M., DASTGHAIB, S., ZAMANI, M., ..., MOKARRAM, P., COOMBS, K.M. & GHAVAMI S. (2021), Autophagy, Unfolded Protein Response, and Neuropilin-1 Cross-Talk in SARS-CoV-2 Infection: What Can Be Learned from Other Coronaviruses. International Journal of Molecular Sciences 22(11): 5992.

SIU, K.L., YUEN, K.S., CASTAÑO-RODRIGUEZ, C., ..., YUEN, K.Y., ENJUANES, L. & JIN, D.Y. (2019), Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF3a Protein Activates the NLRP3 Inflammasome by Promoting TRAF3-Dependent Ubiquitination of ASC. FASEB Journal 33(8): 8865-8877.

SMIESZEK, S.P., PRZYCHODZEN, B.P. & POLYMEROPOULOS, M.H. (2020), Amantadine Disrupts Lysosomal Gene Expression: A Hypothesis for COVID19 Treatment. International Journal of Antimicrobial Agents 55(6): 106004.

SNIJDER, E.J., LIMPENS, R.W.A.L., DE WILDE, A.H., ..., FAAS, F.F.G.A., KOSTER, A.J. & BÁRCENA, M. (2020), A Unifying Structural and Functional Model of the Coronavirus Replication Organelle: Tracking Down RNA Synthesis. PLoS Biology 18(6): e3000715.

SOLA, I, ALMAZÁN, F., ZÚÑIGA, S. & ENJUANES, L. (2015), Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. Annual Review of Virology 2(1): 265-288.

SUN, D., CHEN, S., CHENG, A. & WANG, M. (2016), Roles of the Picornaviral 3C Proteinase in the Viral Life Cycle and Host Cells. Viruses 8(3): 82.

TAKEDA, M. (2022), Proteolytic Activation of SARS-CoV-2 Spike Protein. Microbiology and Immunology 66(1): 15-23.

TAN, Y., SCHNEIDER, T., LEONG, M., ARAVIND, L. & ZHANG, D. (2020), Novel Immunoglobulin Domain Proteins Provide Insights into Evolution and Pathogenesis of SARS-CoV-2-Related Viruses. mBio 11(3): e00760-20.

TAYLOR, A., FOO, S.S., BRUZZONE, R., DINH, L.V., KING, N.J. & MAHALINGAM, S. (2015), Fc Receptors in Antibody-Dependent Enhancement of Viral Infections. Immunological Reviews 268(1): 340-364.

V'KOVSKI, P., KRATZEL, A., STEINER, S., STALDER, H. & THIEL, V. (2021), Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2. Nature Reviews Microbiology 19(3): 155-170.

WALLS, A.C., PARK, Y.J., TORTORICI, M.A., WALL, A., MCGUIRE, A.T. & VEESLER, D. (2020), Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. Cell 181(2): 281-292.e6.

WANG, H., YANG, P., LIU, K., GUO, F., ZHANG, Y., ZHANG, G. & JIANG, C. (2008), SARS Coronavirus Entry into Host Cells through a Novel Clathrin- and Caveolae-Independent Endocytic Pathway. Cell Research 18(2): 290-301.

WANG, M.Y., ZHAO, R., GAO, L.J., GAO, X.F., WANG, D.P. & CAO, J.M. (2020), SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10: 587269.

WOLFF, G., LIMPENS, R.W.A.L., ZEVENHOVEN-DOBBE, J.C., ..., KOSTER, A.J., SNIJDER, E.J. & BÁRCENA, M. (2020), A Molecular Pore Spans the Double Membrane of the Coronavirus Replication Organelle. Science 369(6509): 1395-1398.

WU, J., YUAN, X., WANG, B., ..., XIANG, X., TANG, L. & SUN, H. (2020), Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: From Gene Structure to Pathogenic Mechanisms and Potential Therapy. Frontiers in Microbiology 11: 1576.

YAN, L., GE, J., ZHENG, L., ..., WANG, Q., RAO, Z. & LOU, Z. (2021), Cryo-EM Structure of an Extended SARS-CoV-2 Replication and Transcription Complex Reveals an Intermediate State in Cap Synthesis. Cell 184(1): 184-193.e10.

YANG, R., ZHAO, Q., RAO, J., ..., JIN, Z., LIU, L. & LIU, Z. (2021), SARS-CoV-2 Accessory Protein ORF7b Mediates Tumor Necrosis Factor-α-Induced Apoptosis in Cells. Frontiers in Microbiology 12: 654709.

YAO, H., SONG, Y., CHEN, Y., ..., SHI, Y., LI, L. & LI, S. (2020), Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. Cell 183(3): 730-738.e13.

YUAN, Z., HU, B., XIAO, H., ..., ZHANG, Y., CAI, K. & DING, B. (2022), The E3 Ubiquitin Ligase RNF5 Facilitates SARS-CoV-2 Membrane Protein-Mediated Virion Release. mBio 13(1): e0316821.

ZEHRA, Z., LUTHRA, M., SIDDIQUI, S.M., SHAMSI, A., GAUR, N.A. & ISLAM, A. (2020), Corona Virus versus Existence of Human on the Earth: A Computational and Biophysical Approach. International Journal of Biological Macromolecules 161: 271-281.

ZHANG, Q., XIANG, R., HUO, S., ZHOU, Y., JIANG, S., WANG, Q. & YU, F. (2021), Molecular Mechanism of Interaction between SARS-CoV-2 and Host Cells and Interventional Therapy. Signal Transduction and Targeted Therapy 6(1): 233.

ZHAO, Y., ZHAO, Z., WANG, Y., ZHOU, Y., MA, Y. & ZUO, W. (2020), Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. American Journal of Respiratory and Critical Medicine 202(5): 756-759.

ZHOU, P., YANG, X.L., WANG, X.G., ..., WANG, Y.Y., XIAO, G.F. & SHI, Z.L. (2020), A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. Nature 579(7798): 270-273.

ZHU, N., WANG, W., LIU, Z., ..., WU, G., SONG, J. & TAN, W. (2020), Morphogenesis and Cytopathic Effect of SARS-CoV-2 Infection in Human Airway Epithelial Cells. Nature Communications 11(1): 3910.

ZIEGLER, C.G.K., ALLON, S.J., NYQUIST, S.K., ..., SHALEK, A.K. & ORDOVAS-MONTANES, J. (2020), HCA LUNG BIOLOGICAL NETWORK. SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. Cell 181(5): 1016-1035.e19.

ZINZULA, L. (2021), Lost in Deletion: The Enigmatic ORF8 Protein of SARS-CoV-2. Biochemical and Biophysical Research Communications 538: 116-124.

ZOU, X., CHEN, K., ZOU, J., HAN, P., HAO, J. & HAN, Z. (2020), Single-Cell RNA-Seq Data Analysis on the Receptor ACE2 Expression Reveals the Potential Risk of Different Human Organs Vulnerable to 2019-nCoV Infection. Frontiers in Medicine 14(2): 185-192.

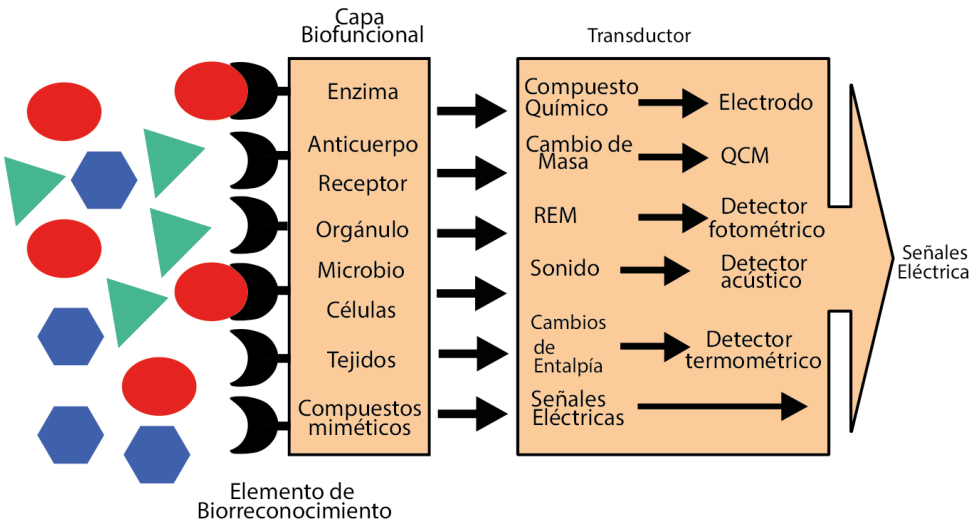
Capítulo XVI
Biosensores electroquímicos en el diagnóstico y pronóstico del SARS-CoV-2

Beatriz Jurado Sánchez y Fidel Ortega Ortiz de Apodaca*
Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá
** Académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia (IdE)*

1. BIOSENSORES

De acuerdo con Turner y colaboradores, el término biosensor se reserva para definir un dispositivo analítico que incorpora un elemento biológico o biomimético íntimamente asociado con un transductor fisicoquímico, que en presencia del analito produce una señal eléctrica discreta o de carácter continuo, proporcional a la cantidad presente del mismo (Turner *et al.* 1987). De acuerdo con lo que establece la IUPAC, no debe confundirse con un sensor químico implantado en una matriz biológica para obtener datos de la misma, ya que si carece del elemento biológico no se corresponderá con un biosensor (Nagel *et al.* 1992). Los biosensores pueden clasificarse de acuerdo con el elemento de reconocimiento empleado (biocatalíticos o de afinidad) o según el sistema de transducción empleado (electroquímicos, ópticos o piezoeléctricos).

Los biosensores representan una disciplina multidisciplinar objeto de una elevada investigación fundamental y aplicada en el ámbito de la química analítica. El uso de biosensores permite el desarrollo de metodologías rápidas que evitan el tratamiento previo de la muestra. La eficacia del biosensor es evaluada en base a su sensibilidad, límite de detección, intervalo dinámico lineal, reproducibilidad, precisión, así como selectividad o respuesta a especies interferentes. Otros parámetros cruciales son el tiempo de respuesta del biosensor, facilidad de uso, capacidad de almacenamiento y portabilidad. Todas estas características son cruciales dada la importancia de los biosensores para el control y diagnóstico de



Esquema de un biosensor. Adaptado de Ortega 2006

enfermedades virales como la originada en la pandemia causada por el SARS-CoV-2 (Zhang and Lieber 2016, Simon *et al.* 2016, Li *et al.* 2023, Fendi *et al.* 2023, Tamborelli *et al.* 2023, Park *et al.* 2023).

2. BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS: DEFINICIÓN Y TIPOS

Los biosensores más empleados en el ámbito clínico, analítico y farmacéutico son los electroquímicos debido a sus mejores prestaciones analíticas, bajo coste, portabilidad y facilidad para su miniaturización, si bien son también numerosas las propuestas basadas en biosensores ópticos en el diagnóstico de enfermedades como la COVID-19 (Maddali *et al.* 2021). En este contexto, un (bio)-sensor electroquímico es un tipo de sensor que contiene un elemento de reconocimiento biológico (enzimas, proteínas, anticuerpos) incorporado en un electrodo que actúa como transductor. El analito o analitos de interés reaccionan selectivamente con el biorreceptor, generando una corriente eléctrica proporcional a la concentración del mismo. Un procesador de señal convierte esta señal electroquímica en un voltaje o potencial que se puede cuantificar y relacionarse con la concentración del analito (Ronkainen *et al.* 2010). Un esquema típico de un biosensor electroquímico se ilustra en la figura 1.

En los biosensores electroquímicos se monitoriza la señal generada por una reacción electroquímica que ocurre en la interfase electrodo-disolución. Esta señal puede producirse mediante la generación de una corriente medible (amperometría), una acumulación de potencial (potenciometría) o un cambio en la conductividad entre dos electrodos (conductimetría). Por otro lado, también puede emplearse la espectroscopia de impedancia midiendo la resistencia y/o reactancia en el biosensor modificado con diversos receptores. Las aplicaciones de estos biosensores son muy numerosas y abarcan todo tipo de analitos de interés clínico, entre los que se encuentran lo virus y las enfermedades que estos producen. Invito al lector a consultar el trabajo de Brazaca y colaboradores, recientemente publicado en la revista *Analitica Química Acta*, para dimensionar su extensión (Brazca *et al.* 2021) así como el trabajo de revisión de Kudr *et al.* publicado en *TRAC*, planteado como un desafío ante la enfermedad COVID-19 (Kudr *et al.* 2021).

Su gran expansión en los últimos años se debe también, en gran medida, a los avances que los nuevos biomateriales vienen registrando (Erdem *et al.* 2021), entre los que se encuentran el grafeno (Sengupta y Hussain 2021), los nanotubos de carbono multipared (MWCNTs), y electrodos serigrafiados recubiertos de polidimetilsiloxano (PDMS) (Gowri *et al.* 2021), así como los polímeros conductores (Tran *et al.* 2021).

Los biosensores electroquímicos pueden clasificarse en dos grandes categorías en función del tipo de evento de reconocimiento biológico empleado: biosensores biocatalíticos y biosensores de afinidad. En los biosensores biocatalíticos se emplea como biorreceptor una enzima, células o tejido biológico, que reconocen selectivamente al analito, generándose especies electroactivas relacionadas con la concentración del mismo. Por otro lado, los biosensores de afinidad se basan en el evento de reconocimiento especifico del analito por un biorreceptor biológico como un anticuerpo (Wang 2006). También se pueden clasificar de forma más simplificada de acuerdo al tipo de receptor biológico empleado en la modificación del biosensor: biosensores no enzimáticos, enzimáticos, genosensores, inmunosensores y citosensores (Zhu *et al.* 2015). Esta última clasificación, por su simplicidad, será el hilo conductor de este capítulo para la descripción de los tipos de biosensores desarrollados para la detección del virus SARS-CoV-2 así como de los biomarcadores relacionados con infecciones producidas por el mismo.

Tanto en los biosensores biocatalíticos como en los de afinidad, el material empleado en el electrodo juega un papel fundamental en el desempeño del biosensor,

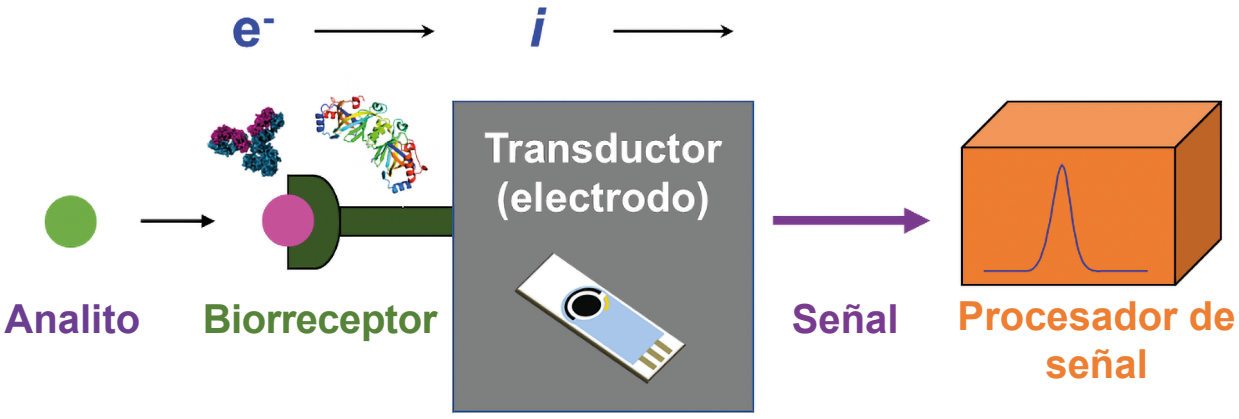


Figura 1. Diagrama esquemático con las partes de un biosensor electroquímico

así como en sus características analíticas finales. En este contexto, el empleo de nanomateriales (carbono, fullerenos, nanopartículas, etc.) para la modificación de la superficie electródica o como marcadores tras el evento de reconocimiento ha conducido al desarrollo de biosensores con prestaciones muy mejoradas debido al efecto sinérgico con los procesos biocatalíticos, una mejora en la biocompatibilidad o la mejora de la señal en los eventos de reconocimiento de los sensores de afinidad (Walcarius *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2017).

3. BIOSENSORES Y SARS-COV-2

Los coronavirus como el SARS-CoV-2 presentan una configuración muy característica conformada por diversas estructuras que pueden utilizarse como receptores específicos para el posterior desarrollo de biosensores. Como puede observarse en la figura 2, el virus está constituido por una cadena de RNA que está envuelta por una bicapa de lípidos constituida por cuatro proteínas: la proteína S (espícula), la proteína E (envuelta), la proteína M (membrana) y la proteína N (nucleocápside) (Lu *et al.* 2020). Cada una de estas partes juega un papel fundamental en la virulencia del virus, además de servir como diana base en el desarrollo de sensores electroquímicos para la detección del RNA del virus o las distintas proteínas, como se explicará en las siguientes secciones.

Las metodologías actuales más utilizadas en su diagnóstico se basan, principalmente, bien en la identificación y cuantificación del material genético, o el uso de inmunoensayos con anticuerpos frente a las diferentes partes del virus (Mattioli *et al.* 2020, Pang *et al.* 2024, Nishimura *et al.* 2023, Vellas *et al.* 2023).

Los biosensores electroquímicos juegan un papel fundamental en el diagnóstico de SARS-CoV-2 debido a su bajo coste, portabilidad y especificidad. Así, se han desarrollado sendos sensores para la detección de SARS-CoV-2 empleando como diana la proteína N, la proteína S, la proteína M en formato simple o multiplexado. En otro gran grupo de estrategias se han empleado genosensores para la detección del RNA viral, así como biosensores para la detección de inmunoglobulinas (IgG e IgM) marcadoras de la infección. La figura 3 muestra un resumen de los tipos de biosensores descritos hasta la fecha en la detección de diversos marcadores de SARS-CoV-2. Esta figura servirá como hilo conductor de este apartado, en el que se describirá brevemente el funcionamiento de cada sensor y se expondrán algunos ejemplos aplicados al diagnóstico de SARS-CoV-2.

3.1. (Bio)sensores directos

En este tipo de biosensores, también denominados como no enzimáticos, se basan en la electrooxidación directa del analito en el electrodo, empleando diversos nanomateriales con actividad catalítica (nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, óxidos nanometálicos, etc). Este tipo de sensor surgió como alternativa a los basados en enzimas, que, si bien poseen una alta selectividad, presentan un elevado coste y están limitados por las dificultades en la estabilidad inherentes al empleo de enzimas. Como alternativa en aras de aumentar la estabilidad y disminuir la complejidad y el coste de los biosensores enzimáticos, se desarrollaron sensores no enzimáticos basados en nanomateriales como óxidos de níquel, nanotubos de carbono, fullerenos, etc, que presentan actividad catalítica similar a la proporcionada por las enzimas (Zhu *et al.* 2015). Los más descritos hasta la fecha se han aplicado a la determinación de moléculas pequeñas como peróxido de hidrógeno, glucosa y dopamina (Miao *et al.* 2014, Chen *et al.* 2014).

Se han descrito diversos sensores no enzimáticos para la detección de SARS-CoV-2 empleando como objetivo distintas partes distintivas del virus. Así, se ha

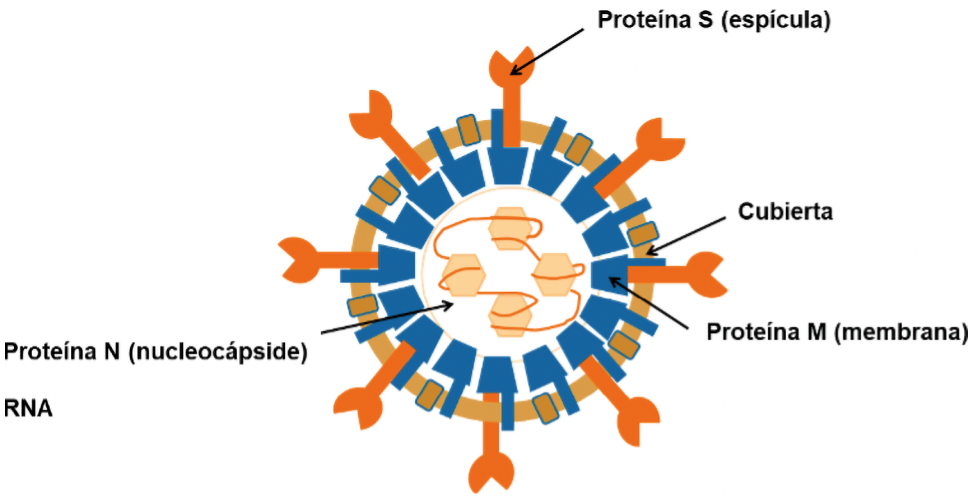


Figura 2. Estructura del virus SARS-CoV-2

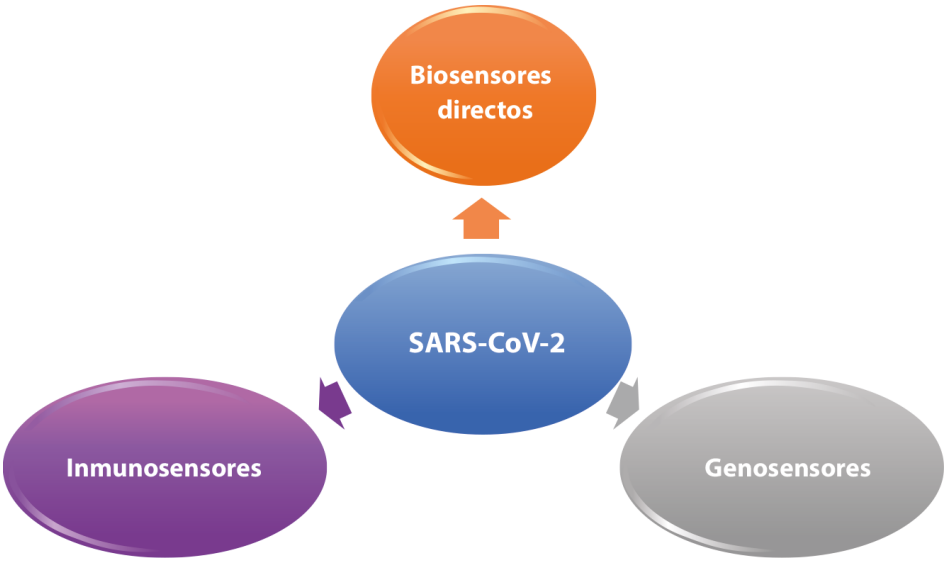


Figura 3. Clasificación de los biosensores para la detección de SARS-CoV-2

desarrollado un biosensor electroquímico basado en polímeros de impronta molecular para la determinación de la proteína N del virus SARS-CoV-2. El nanomaterial de reconocimiento está integrado en un electrodo serigrafiado desechable –con un electrodo de trabajo de oro– que permite su integración en un potenciostato portable para detección rápida en muestras nasofaríngeas. El principio de detección se basa en el empleo del par redox ferricianuro/ferrocianuro y la voltamperometría diferencial de impulsos. En ausencia de SARS-CoV-2, se registra una elevada señal proveniente de la transferencia de electrones entre el par redox. Sin embargo, si el SARS-CoV-2 está presente en la muestra, este se une a la superficie del electrodo, evitando la transferencia electrónica hacia el mismo y provocando una disminución de la señal que puede relacionarse con la concentración del virus en la muestra. El intervalo lineal del sensor está comprendido en el intervalo de los 50 hasta 111 fM para la proteína N objetivo, con un tiempo de detección inferior a una hora (Raziq *et al.* 2021). Un esquema de la estrategia de detección se ilustra en la figura 4.

Empleando como receptor la proteína S, se han diseñado sensores para la determinación de SARS-CoV-2, utilizando electrodos serigrafiados modificados con nanotubos de dióxido de titanio funcionalizados con cobalto para la detección amperométrica de SARS-CoV-2, con un intervalo de linealidad comprendido entre 14 y 14.000 nM (Vadlamani *et al.* 2020).

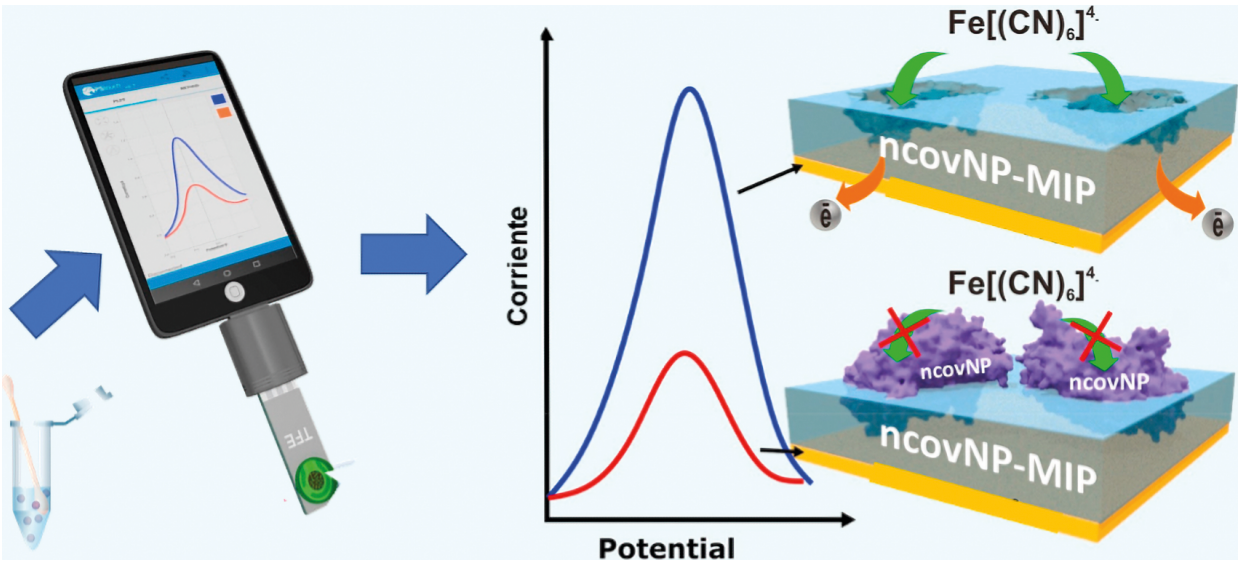


Figura 4. Sensor electroquímico directo basado en polímeros de impronta molecular para la detección de la proteína N del SARS-CoV-2 en saliva. Adaptado de la referencia (Raziq *et al.* 2021)

Se ha llevado a cabo además la detección directa de anticuerpos monoclonales IgG contra la proteína S del virus en muestras de sangre en tan solo 1 minuto, utilizando un sensor basado en la modificación del electrodo de trabajo con óxido de grafeno y nanoestrellas de oro. El nanomaterial se activa para la introducción de diversos grupos funcionales reactivos para interacción con la IgG. Mediante medidas de voltamperometría o impedancia en conexión con el par redox ferricianuro/ferrocianuro, ha sido posible determinar este analito con una elevada sensibilidad y selectividad (Alireza Hashemi *et al.* 2021).

3.2. Genosensores

Los genosensores son un tipo de biosensor que emplean DNA monocatenario (ssDNA) como elemento de reconocimiento inmovilizado en el electrodo. Este ssDNA interacciona con DNA o proteínas virales mediante hibridación. En presencia del híbrido complementario, se generan señales específicas basadas en distintos principios y mecanismos químicos que se detectan electroquímicamente (Shen *et al.* 2014, Du *et al.* 2014, Cunningham *et al.* 2014).

En el caso del SARS-CoV-2, la proteína N juega un papel fundamental en la encapsulación del genoma del virus. Además, se ha demostrado que puede interaccionar con otras proteínas y con RNA o ssDNA, permitiendo el desarrollo de genosensores específicos para la detección rápida del virus (McBride *et al.* 2014, Malla *et al.* 2023). En este contexto, un biosensor basado en grafeno se ha modificado con 4 receptores de ssDNA específicos para dos regiones identificadas en la proteína N del SARS-CoV-2. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad del método, se llevó a cabo la inmovilización del ssDNA en nanopartículas de oro depositadas sobre un electrodo de papel (ver fig. 5). La hibridación del ssDNA en presencia del virus se traduce en un incremento de la señal analítica, permitiendo la determinación rápida del mismo con límites de detección por debajo de las 6,9 copias/µL con un tiempo de análisis inferior a 5 minutos en muestras nasofaríngeas (Alafeef *et al.* 2020).

Adicionalmente, se ha diseñado un genosensor para la determinación del virus SARS-CoV-2 en muestras de sangre y suero empleando como diana la proteína N, obteniendo límites de detección en el rango fentomolar (fM) para la determinación del virus en muestras de suero (Song *et al.* 2021).

En una configuración más sofisticada se ha llevado a cabo la determinación simultánea en formato multiplexado de las proteínas N y S del virus. El ensayo se basa en la replicación en círculo rodante isotérmico (RCA) para la detección rápida de SARS-CoV-2. El ensayo implica la hibridación del RNA del virus con amplicones RCA funcionalizados con marcadores redox que pueden ser detectados electroquímicamente mediante voltamperometría diferencial de impulsos. El ensayo puede

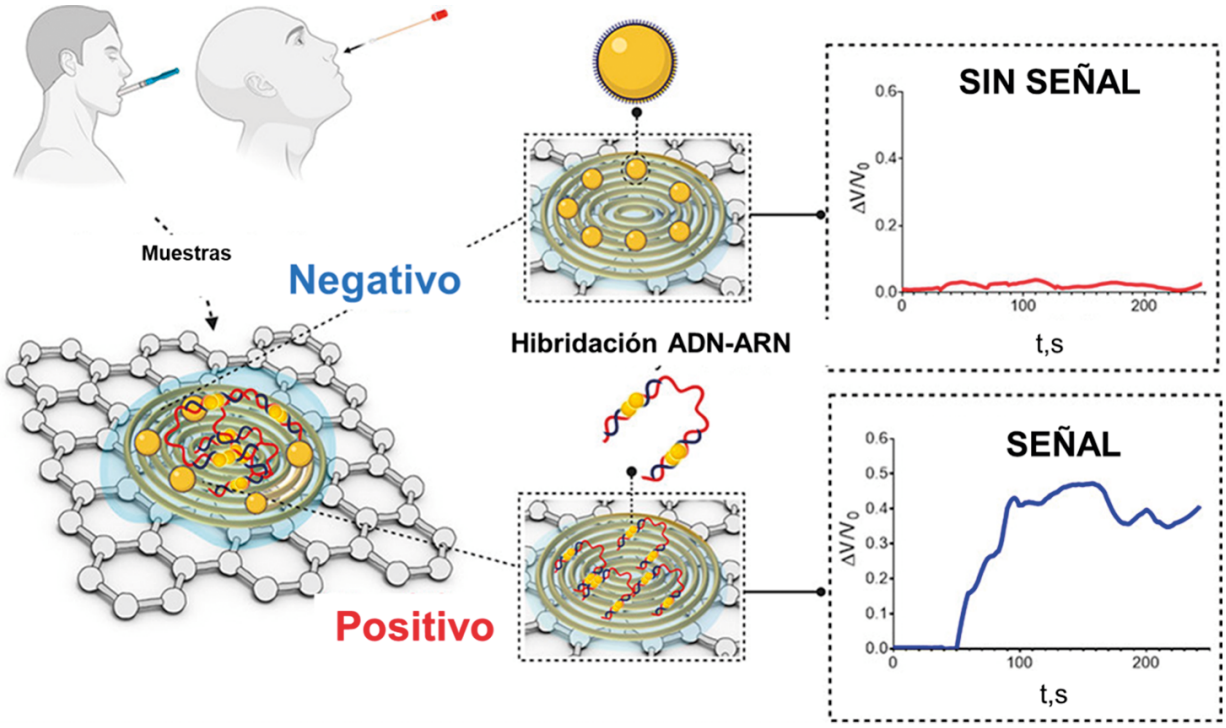


Figura 5. Genosensor electroquímico para la detección la proteína N del SARS-CoV-2 en saliva. Los círculos amarillos representan nanopartículas de oro. Adaptado de la referencia (Alafeef *et al.* 2020)

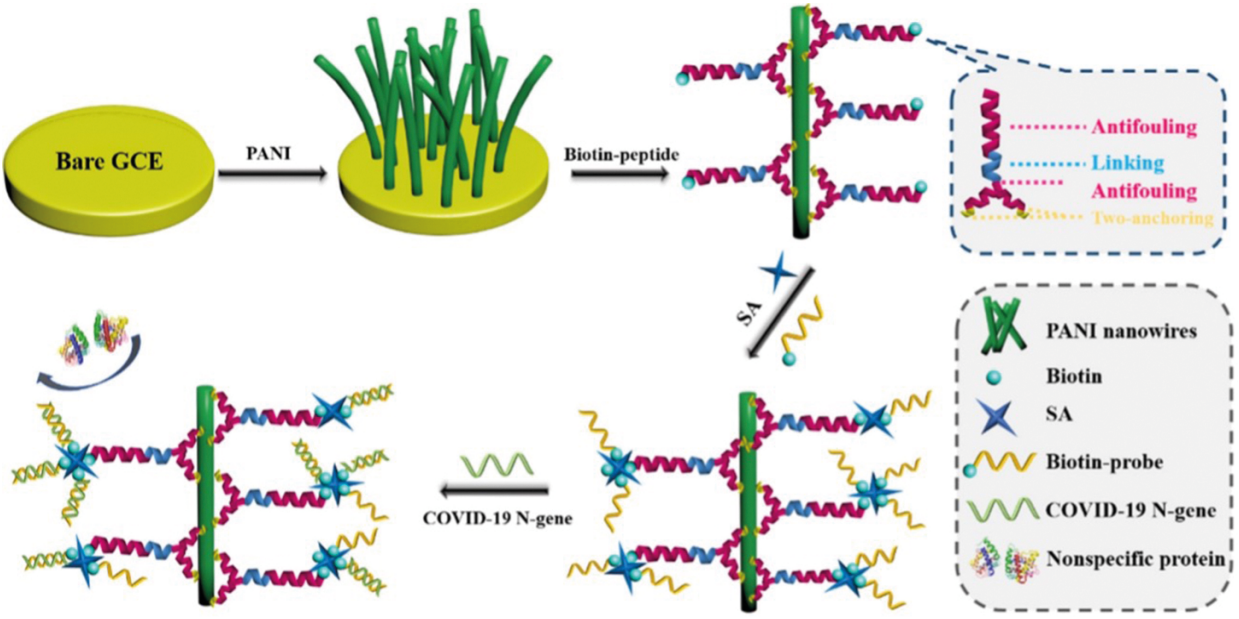


Figura 6. Diagrama esquemático del proceso de fabricación del «genosensor antifouling COVID-19».
Tomada con permiso de Song *et al.* 2021, Copyright (2021) American Chemical Society

detectar tan solo 1 copia/µL de los genes N y S, en menos de 2 h. La estrategia se validó empleando 106 muestras clínicas, incluidas 41 SARS-CoV-2 positivas y 9 muestras positivas para otros virus respiratorios, con una excelente concordancia, demostrando el potencial de este biosensor para su aplicabilidad práctica en la clínica de rutina (Chaibun *et al.* 2021).

Los genosensores también son muy adecuados para la detección del RNA viral del SARS-CoV-2 (Tamborelli *et al.* 2023, Ali Farzin *et al.* 2022, Cajigas *et al.* 2022). Así, se ha desarrollado un biosensor empleando electrodos de platino-titanio inmovilizados sobre un sustrato de vidrio. Los electrodos se modificaron con ssDNA específicos y tras la hibridación con el RNA viral libre se llevó a cabo la detección empleando FTIR (Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier) y medidas de capacitancia antes y después de la interacción con el analito; alcanzándose límites de detección en el intervalo nM con alta selectividad (Hwang *et al.* 2021). En otro genosensor similar se ha empleado la misma configuración para la captura del RNA pero en este caso se ha utilizado $Ru(NH_3)_6^{3+}$ para amplificar la señal electroquímica tras la hibridación, alcanzando límites de detección de 26 fM en suero y saliva de pacientes con infección activa (Peng *et al.* 2021).

Cuando se trabaja con muestras complejas, como los fluidos biológicos, uno de los inconvenientes principales utilizando biosensores elctroquímicos, radica en la posibilidad de que biomoléculas u otras sustancias presentes en la matriz se acumulen por adsorción en la superficie sensora (biofouling), reduciendo su eficacia en la respuesta (Song *et al.* 2021). Para evitar este inconveniente, Song y colaboradores diseñaron un genosensor construido mediante la combinación de nanohilos de polianilina electropolimerizada (PANI) y péptidos específicos que recubren su superficie y diseñados para la detección del gen COVID-19 N. Estos péptidos poseen una estructura en forma de i griega invertida con dos anclajes sobre el nanohilo, que evita la adsorción de biomoléculas en los mismos por un efecto «antifouling». La combinación nanohilo-péptido, marcado con biotina, se deposita sobre un electrodo de carbón vítreo que actuará como electrodo de trabajo en una configuración electroquímica de tres electrodos. El genosensor (Fig 6) se basa en la afinidad del sistema biotina-estreptavidina, utilizando sondas específicas para el gen N del COVID-19 marcadas, también, con biotina e inmovilizadas sobre el péptido utilizando estreptavidina. La cuantificación electroquímica se lleva a cabo mediante voltamperometría diferencial de impulso (DPV) y voltamperometría cíclica (CV), en un intervalo de detección de -0,6 a +0,6 V con una velocidad de barrido de 100 mV/s con una amplitud de 50mV, a pH 7,4. El dispositivo presenta un intervalo lineal entre 10^{-14} a 10^{-9} M y un límite de detección de 3,5 fM, demostrando su utilizad incluso en muestras de suero (Song *et al.* 2021).

3.3. Inmunosensores

Los inmunosensores son un tipo de biosensor basado en la interacción de un antígeno con un anticuerpo específico. Son plataformas de detección muy establecidas y usadas en laboratorios de rutina para el diagnóstico de

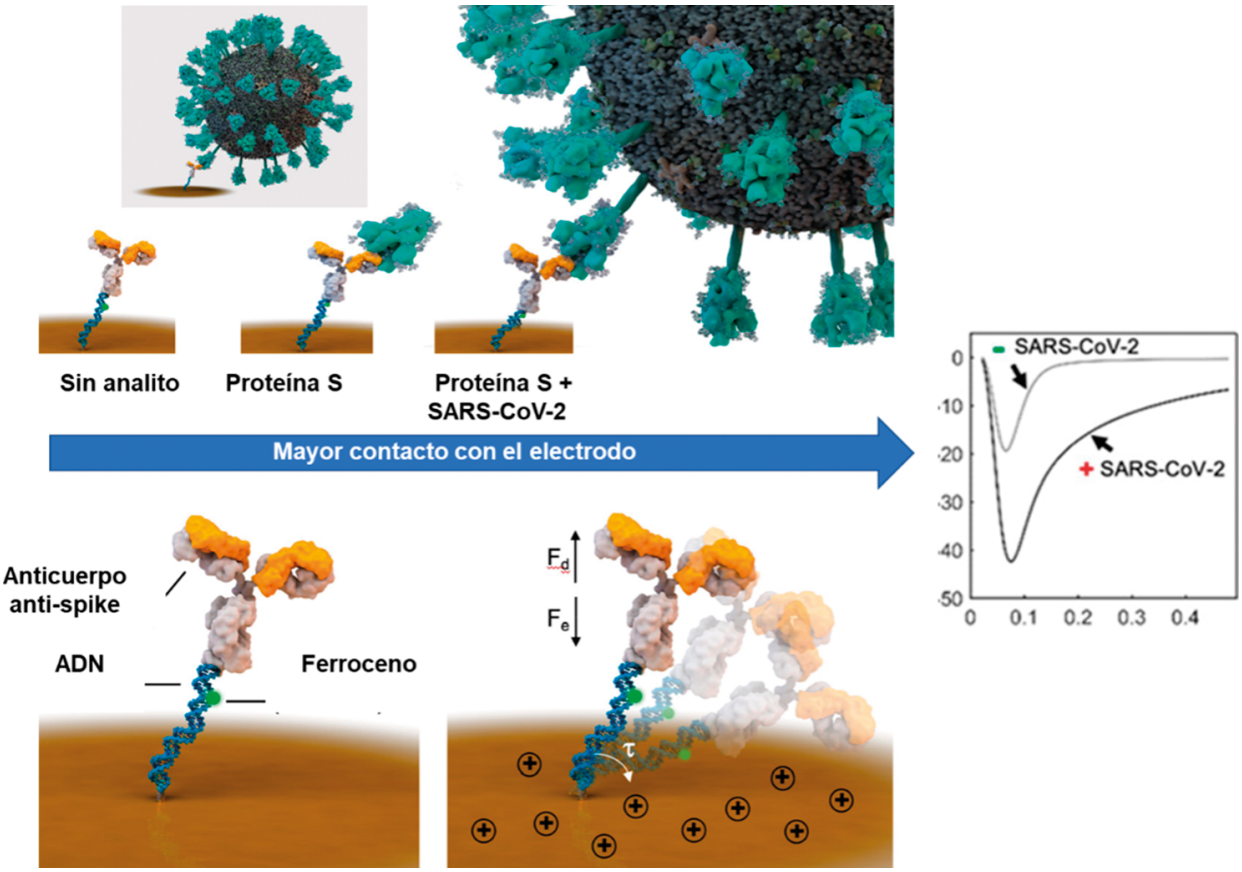


Figura 7. Inmunosensor electroquímico para la detección la proteína S y el SARS-CoV-2 en saliva. Los círculos amarillos representan nanopartículas de oro. Adaptado de la referencia (Yousefi *et al.* 2021)

enfermedades, en aplicaciones de seguridad alimentaria o para control medioambiental. Existen numerosos kits comerciales para la determinación de un gran número de analitos. Los inmunosensores electroquímicos son especialmente atractivos en diversas aplicaciones debido a sus excelentes características analíticas, un menor coste y la posibilidad para su integración en dispositivos desechables de papel (Felix and Angnes 2018).

La proteína S del SARS-CoV-2 tiene dos subunidades características, S1 y S2 responsables de la interacción del virus con los receptores celulares, fusión y entrada en la célula huésped, respectivamente. Estas subunidades son una diana muy adecuada para el diseño de anticuerpos específicos para la detección del virus. Así, se ha utilizado un anticuerpo específico anti-spike modificado con DNA marcado con ferroceno. Cuando se aplica un potencial positivo, el receptor se pliega sobre la superficie del electrodo mediante fuerzas hidrodinámicas, siendo la tendencia mayor cuando el virus está unido. Esto favorece la transferencia electrónica en el ferroceno cuando se aplica el potencial positivo, aumentando la señal. Mediante la cronoamperometría, se puede detectar la presencia de partículas virales y proteínas, ya que estas especies aumentan la resistencia hidrodinámica del sensor (ver fig. 7). El sensor permite la detección virus SARS-CoV-2 y su proteína de S en 5 minutos en muestras de saliva (Yousefi *et al.* 2021).

En otra configuración se han diseñado electrodos de grafeno reducido mediante impresión 3D integrados en una plataforma microfluídica. Los electrodos se modificaron posteriormente con antígenos específicos, que pueden interaccionar selectivamente con anticuerpos anti-S del SARS-CoV-2 así como con el receptor S1 de esta proteína, resultando en un cambio de la señal de impedancia inicial del electrodo. Se alcanzaron límites de detección comprendidos en el intervalo 3-17 fM (Ali *et al.* 2021). En un sensor similar también basado en medidas de impedancia se han utilizado micropocillos modificados con el receptor S1 de la proteína S en formato competitivo empleando anticuerpos anti-SARS-CoV-2 y el SARS-CoV-2 presente en las muestras (Rashed *et al.* 2021).

Un sensor portable (denominado como eCovSens) se basa en el empleo de electrodos de óxido de estaño modificados con nanopartículas de oro modificadas, a su vez, con anticuerpos específicos anti-SARS-CoV-2. La interacción con el virus produce cambios en la conductividad eléctrica del electrodo que pueden monitorizarse empleando un potenciostato. Se obtuvieron límites de

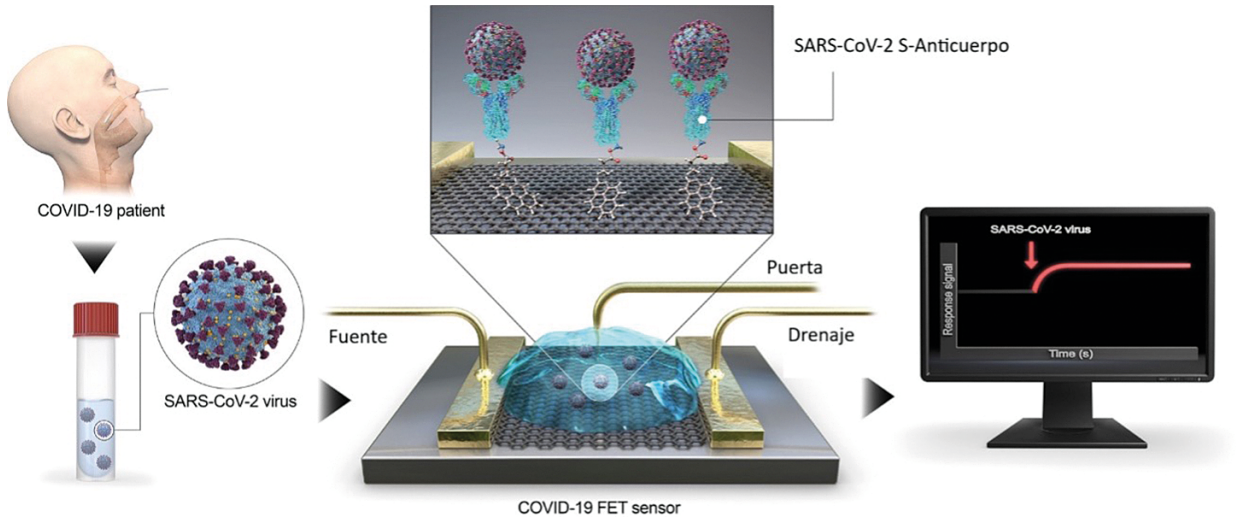


Figura 8. Diagrama esquemático y funcionamiento del biosensor del COVID-19 FET. Imagen adaptada de Seo *et al.* 2020, disponible vía ACS COVID-19 subset. Copyright ACS 2020

detección de 90 fM en muestras de saliva fortificadas con el virus (Mahari *et al.* 2020).

Seo y colaboradores desarrollaron un biosensor electroquímico, para la detección del SARS-CoV-2 en muestras clínicas, que no requiere pretratamiento de muestras ni utilización de marcadores para producir la señal, que se basa en la utilización de un transistor de efecto de campo (FET) en el que láminas de grafeno sobre las que se inmovilizan anticuerpos frente a la proteína S del virus constituyen la puerta del Transistor. El rendimiento del sensor se determinó utilizando proteína antígénica, muestras de virus cultivados e hisopos nasofaríngeos de pacientes con COVID-19 (fig. 8). El dispositivo FET puede detectar la proteína S del SARS-CoV-2 a concentraciones de 1 fg/mL en disolución salina tamponada con fosfato y de 100 fg/mL en el medio de transporte clínico. El dispositivo detectó también el SARS-CoV-2 en muestras de cultivo con una sensibilidad de $1{,}6 \times 10^{1}$ pfu/mL y muestras clínicas de $2{,}42 \times 10^{2}$ copias/mL (Seo *et al.* 2020).

Utilizando esta nueva generación de Biosensores de grafeno basados en FET (gFET) y aprovechando las ventajas que supone «arrugar» el grafeno generando superficies cóncavas que incrementan su sensibilidad en la detección del DNA, Park y colaboradores desarrollan un biosensor gFET portable que combina la capacidad de amplificación isotérmica en bucle de la enzima transcriptasa inversa (RT-LAMP) y la elevada sensibilidad y selectividad asociadas a la detección electroquímica empleando grafeno arrugado, dada la ventaja de que este tipo de grafeno presenta la capacidad de adsorber selectivamente las secuencias de DNA monocatenario (ssDNA) mediante enlaces π–π no covalentes y de no enlazar las de DNA bicatenarias (dsDNA). Este dispositivo ha demostrado su capacidad para detectar la presencia del virus SARS-CoV-2 en un intervalo de 10 a 10^{4} copies/µL en el medio de transporte vírico de 20 muestras clínicas, obteniendo un 100% de especificidad de 10 positivos y 10 negativos con un tiempo de desarrollo de la respuesta de 35 minutos, basada en el cambio de voltaje de Dirac (Park *et al.* 2021).

Basándose en la tecnología CRISPR/Cas, Bruch *et al.* desarrollaron un biosensor electroquímico en un dispositivo microfluídico utilizando la endonucleasa Cas13a, que permite detectar fragmentos de RNA específicos. El método utiliza el fenómeno conocido como actividad de corte colateral mediante el cual al unirse Cas13a al RNA monocatenario diana se activa la actividad de la RNAsa cortando la secuencia de RNA de forma no específica. Para ello se requiere un reportero de una cadena simple de RNA (reRNA) complementario del RNA diana. El reportero se marca con biotina por un lado y con amidita de fluoresceina (6-FAM) por otro, inmovilizándose sobre la superficie del canal microfluídico con estreptavidina (SA). A su vez, un anticuerpo anti FAM sobre el que se ha inmovilizado la enzima Glucosa Oxidasa (GOD), se une al reportero mediante unión inmunoespecífica. En estas condiciones, y en presencia de glucosa, la enzima GOD puede mediar la detección amperométrica del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido, generando una elevada intensidad de corriente en el electrodo de trabajo (fig. 9, B). No obstante, cuando el RNA diana se encuentra presente, la cadena del reportero se rompe por la actividad de la endonucleasa liberando la enzima GOD, por lo que se pierde su actividad enzimática reduciéndose o perdiéndose la detección electroquímica con una bajada drástica de la intensidad de corriente (fig. 10). Para evitar dificultades de acceso por impedimento estérico de la Cas13a al reRNA inmovilizado, se puede sustituir la estreptavidina

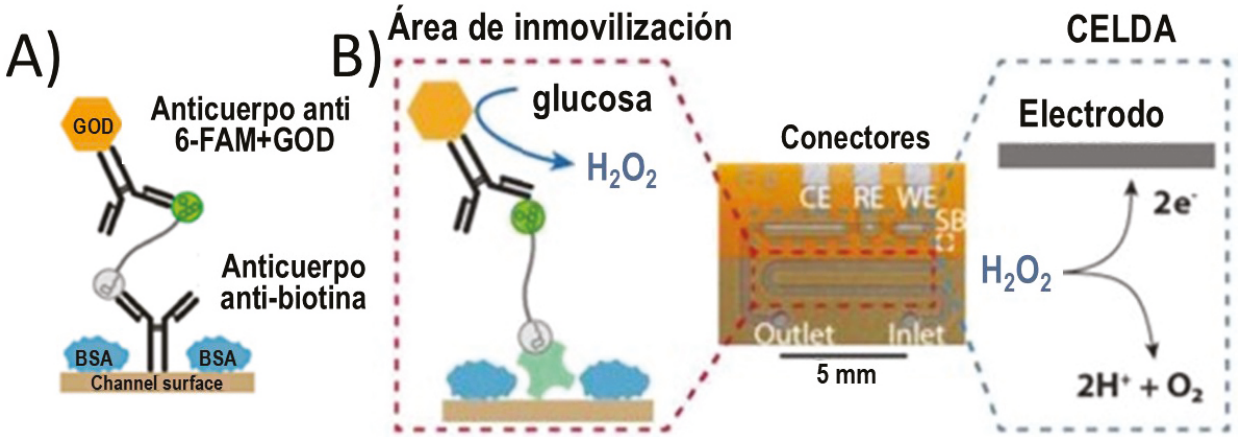


Figura 9. Sistema microfluídico con celda de detección amperométrica. A) utilizando anticuerpo antibiotina como espaciador para inmovilizar el RNA reportero B) Reportero inmovilizado directamente con estreptavidina. Adaptado de Bruch *et al.* 2019. Publicado bajo licencia CC BY 4.0. http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

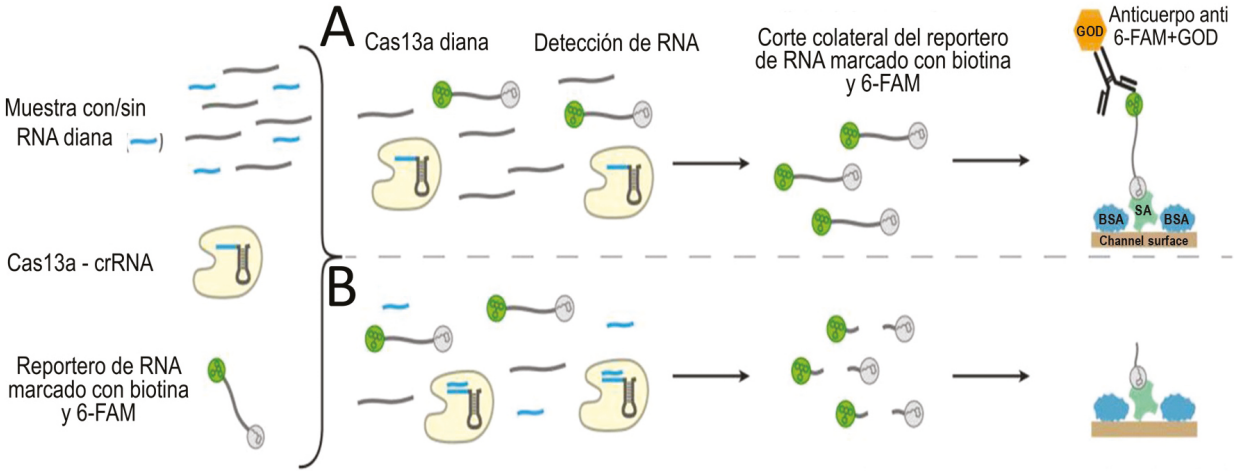


Figura 10. Biosensor electroquímico de RNA basado en el corte colateral del reportero de RNA. (A) En ausencia del RNA diana, el complejo Cas13-crRNA no muestra actividad de corte, por lo que tanto el reportero de RNA como el anticuerpo anti 6-FAM con la enzima GOD permanecen inmovilizados en el soporte, posibilitando la detección del peróxido de hidrógeno. (B) Cuando el RNA diana (analito) se encuentra presente en la muestra el complejo Cas13-crRNA corta el reportero de RNA liberando la glucosa oxidasa cesando la producción de H_2O_2 y la corriente en el electrodo de trabajo. Adaptado de Bruch *et al.* 2019. Publicado bajo licencia CC BY 4.0. http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

por un anticuerpo policlonal antibiotina que actúa a modo de espaciador favoreciendo la accesibilidad de la nucleasa y por tanto su actividad de corte (fig. 9, A).

3.4. Otros biosensores electroquímicos para la detección de biomarcadores útiles en el pronóstico de la COVID-19

Además de la detección del virus mediante su amplificación o identificación de sus proteínas principales, y dado que la infección por SARS-CoV-2 desencadena una importante respuesta inflamatoria, diferentes biomarcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva, la interleucina-6, la procalcitonina y la ferritina, han sido también objeto de análisis, desarrollándose plataformas biosensoras para su determinación. Su cuantificación puede ayudar al diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Garg *et al.* 2021).

Un metaanálisis realizado con 1426 pacientes pone de manifiesto que los niveles de interleucina 6 (IL-6) en el suero de pacientes con COVID-19 se incrementan más de 3 veces respecto a las concentraciones normales, sugiriendo que los pacientes con concentraciones superiores a 55 pg/mL poseen un riesgo elevado de padecer la enfermedad con una manifestación severa de la misma, asociándose un elevado riesgo de mortalidad a concentraciones superiores a 80 pg/mL (Aziz *et al.* 2020). Existen numerosas plataformas biosensoras para la determinación de este biomarcador, utilizando tanto detección electroquímica como óptica, que pueden revisarse en un trabajo de revisión en la revista Sensors (Khan y Mujahid 2020) y que incluyen sistemas Direct

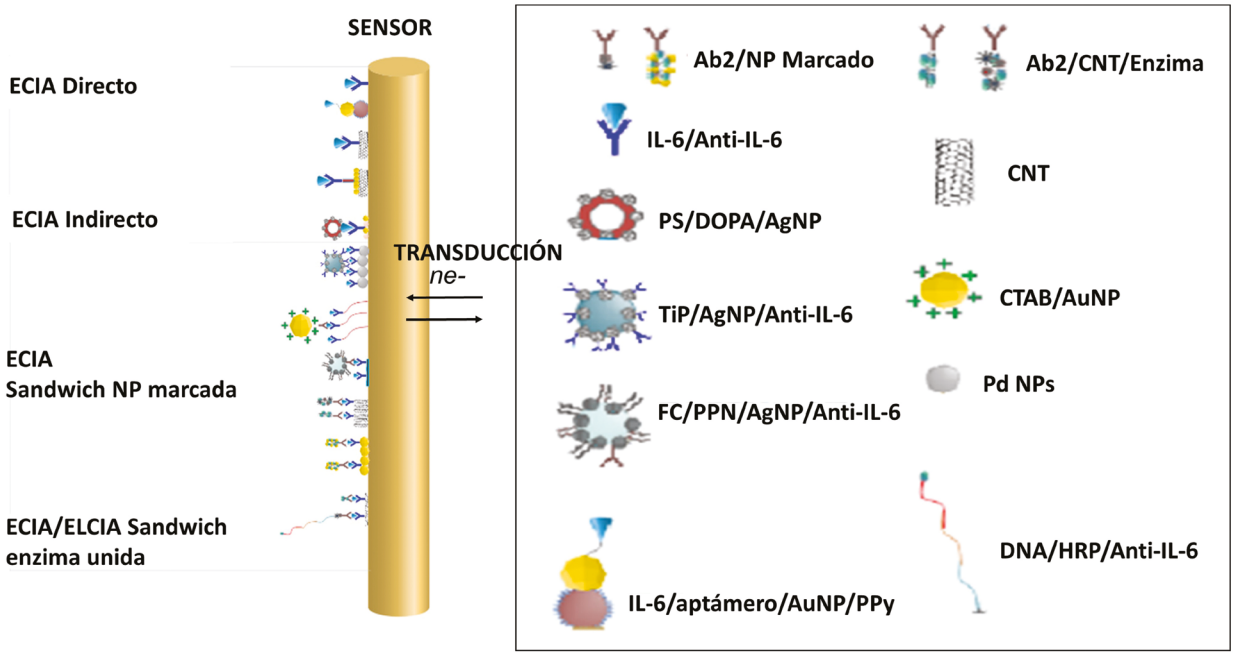


Figura 11. Diferentes mecanismos de detección electroquímica para IL-6. ECIA directo o Inmunoanálisis electroquímico directo (basado en la interacción con anticuerpos primarios (IL-6/Anti-IL-6), la utilización de conjugados de aptámeros sobre nanopartículas de oro y polipirrol (IL-6/aptámero/AuNP/PPy), nanotubos de carbono recubiertos con anticuerpos primarios (CNT/Anti-IL-6) y nanotubos de carbono recubiertos con nanopartículas de oro y anticuerpos primarios (CNT/AuNP-6/Anti-IL-6), ECIA indirecto Inmunoanálisis electroquímico indirecto competitivo en donde un antígeno es enlazado a nanoesferas de poliestireno (PS/DOPA/AgNP/Anti-IL-6). Inmunoanálisis electroquímico tipo Sandwich en donde un anticuerpo secundario (Ab2) es bien adsorbido en nanopartículas fosfato de Titanio y plata (TiP/AgNP/Anti-IL-6), oro (CTAB/AuNP), nanopartículas polímericas poross adsorbidas con ferroceno (FC/PPN/AgNP/Anti-IL-6) o ligadas a un enzima (Ab2/CNT/Enzima) y (DNA/HRP/Anti-IL-6) utilizando nanotubos de carbono (CNT). Adaptada de Khan *et al.* 2020, publicado bajo licencia CC BY 4.0. http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Electrochemical Immunoassay (dECIA), Indirect Competitive Electrochemical Immunoassay (icECIA), Sandwich Nanoparticles Labeled Electrochemical Immunoassay (sECIA-NP) y Sandwich Enzyme Linked Electrochemical Immunoassay (sELECIA) (fig. 11).

La procalcitonina (PCT) es un precursor de la hormona calcitonina que se encuentra en las células como respuesta a una lesión o una infección. Su nivel en condiciones normales se encuentra por debajo de 0,15 ng/mL, mientras que valores superiores a 0,5 ng/mL se relacionan con infecciones graves. Se considera, por tanto, un biomarcador diagnóstico potencial en una sepsis, incrementándose 5 veces la probabilidad de una evolución severa de la enfermedad al sobrepasar este umbral, en comparación con los pacientes con un valor bajo de este marcador (Lippi y Plebani 2020) y puede ayudar también a reconocer otro tipo de infecciones del tracto respiratorio diferenciado entre la infección viral e infecciones de carácter secundario (Pink *et al.* 2021).

Existen numerosas plataformas biosensoras para su determinación basadas en inmunosensores electroquímicos que combinan nanomateriales y estrategias de amplificación de las señales que mejoran la sensibilidad notablemente mediante sistemas electroquimioluminscentes y fotoelectroquímicos (La 2020).

La ferritina es una proteína que utiliza el organismo para el almacenamiento de hierro, jugando un papel muy importante en la regulación de su contenido y concentración sérica, interviniendo en el estrés oxidativo y la regulación de las anemias. Los niveles normales de esta proteína se sitúan en el intervalo de 12-300 ng/mL en varones y de 12-150 ng/mL en mujeres. Recientemente se ha observado que los pacientes graves de COVID-19 muestran niveles que superan los 1000 ng/mL (Zhou *et al.* 2020).

Existen numerosas plataformas biosensoras para la determinación de este marcador, como el inmunosensor fabricado por Garg y colaboradores en el que utilizan un biosensor electroquímico preparado utilizando anticuerpos específicos para la ferritina en un electrodo de trabajo serigrafiado y funcionalizado con puntos cuánticos (QDs) de bisulfuro de wolframio estabilizado con un biosurfactante (WS2-B QDs). La detección se lleva a cabo bien mediante voltamperometría cíclica (CV) o voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), con límites de detección de 6,048 ng/mL y 3,800 ng mL, respectivamente, con un intervalo lineal entre 10-1500 ng/mL. El inmunosensor electroquímico posee una elevada selectividad y es estable alrededor de 60 días (Garg *et al.* 2020).

La proteína C reactiva (CRP) es el biomarcador que se detecta en mayor cuantía en el torrente sanguíneo después de un proceso inflamatorio, en respuesta a una infección. Es producido por las células hepáticas y en condiciones normales en pacientes sanos se encuentra por debajo de 0,3 mg/dL. Su medida puede utilizarse como un indicador tempano de la enfermedad, al detectarse en pacientes con COVID-19 cifras significativamente incrementadas que varían entre 20 y 50 mg/L (Ali 2020).

Entre los dispositivos electroanalíticos más recientes disponibles diseñados para la cuantificación de esta proteína, llama la atención un inmunosensor amperométrico que presenta sensibilidades a nivel de pg/mL. Para conseguirlo los autores utilizan dos sistemas, un nanocomposite conductor de partículas de oro y un líquido iónico de bisulfuro de molibdeno (AuNPs/IL-MoS_2) funcionalizado, que proporciona una elevada área superficial para facilitar la reacción, y sobre el que se inmovilizan los anticuerpos primarios anti-CRP. El segundo componente del biosensor utiliza otro composite de nanopartículas de iridio y 1,5-diaminonaftaleno adsorbido en óxido de grafeno (Ir NPs/GO-DN). Este componente presenta una elevada actividad electrocatalítica para reducir el peróxido de hidrógeno, que es utilizado para generar la señal. El biosensor registra un intervalo lineal de 0,01 a 100 ng/mL y un límite de detección de 3,3 pg/mL (relación señal/ruido S/N = 3) (Ma *et al.* 2020).

CONCLUSIONES

Una de las herramientas que ha demostrado durante la pandemia ser de mayor eficacia en la lucha contra la enfermedad COVID-19 ha sido poder diagnosticarla rápidamente para así prevenir la propagación de la infección. En este sentido, los biosensores se perfilan como una alternativa a los métodos convencionales de diagnóstico molecular, más costosos y lentos. Los biosensores electroquímicos presentan la ventaja de que se pueden miniaturizar lo que facilita su portabilidad, con la posibilidad de detectar concentraciones muy bajas (LOD 6.9 copias/µL), como los biosensores basados en grafeno modificados con receptores de ssDNA específicos, requiriendo un espacio de tiempo muy corto (~ 5 min) para el diagnóstico y evitando, en muchos casos, el uso de marcadores además de utilizar electrodos de papel, un material barato. Los biosensores que emplean electrodos serigrafiados son los que presentan límites de detección más bajos (hasta fM), caracterizándose además por su buena estabilidad. La alternativa de poder utilizar la tecnología CRISPR/Cas, para la detección del RNA, abre una vía para el desarrollo de nuevos biosensores electroquímicos de gran selectividad y sensibilidad. La utilización de la detección electroquímica permite también diseñar plataformas microfluídicas en las que podrían utilizarse diferentes biosensores en una configuración multisensora, de cuya respuesta conjunta podría deducirse el pronóstico y evolución de la enfermedad. Los biosensores electroquímicos que detectan marcadores de inflamación son perfectos candidatos para el diseño de este tipo de plataformas.

BIBLIOGRAFÍA

ALAFEEF, M., DIGHE, K., MOITRA, P. & PAN, D. (2020), Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip. ACS Nano 14(12): 17028-17045.

ALI, N. (2020), Elevated Level of C-Reactive Protein May Be an Early Marker to Predict Risk for Severity of COVID-19. Journal of Medical Virology 92(11): 2409-2411.

ALI, M. A., HU, C., JAHAN, S., ..., JU, E., GAO, S.-J. & PANAT, R. (2021), Sensing of COVID-19 Antibodies in Seconds Via Aerosol Jet Nanoprinted Reduced-Graphene-Oxide-Coated 3D Electrodes. Advanced Materials 33(7): 2006647.

ALIREZA HASHEMI, S., BAHRANI, S., ..., SHOKRIPOUR, M., FIROOZSANI, M. & CHIANG, W.-H. (2021), Ultra-Precise Label-Free Nanosensor Based on Integrated Graphene with Au Nanostars toward Direct Detection of IgG Antibodies of SARS-CoV-2 in Blood. Journal of Electroanalytical Chemistry 894: 115341.

AZIZ, M., FATIMA, R. & ASSALY, R. (2020), Elevated Interleukin-6 and Severe COVID-19: A Meta-Analysis. Journal of Medical Virology 92(11): 2283-2285.

BRAZACA, L.C., DOS SANTOS, P.L., DE OLIVEIRA, P.R., ..., BONACIN, J.A., JANEGITZ, B.C. & CARRILHO, E. (2021), Biosensing Strategies for the Electrochemical Detection of Viruses and Viral Diseases – A Review. Analytica Chimica Acta 1159: 338384.

BRUCH, R., BAASKE, J., CHATELLE, C., ..., WEBER, W., DINCER, C. & URBAN, G.A. (2019), CRISPR/Cas13a-Powered Electrochemical Microfluidic Biosensor for Nucleic Acid Amplification-Free miRNA Diagnostics. Advanced Materials 31(51): e1905311.

CAJIGAS, S., ALZATE, D., FERNÁNDEZ, M., MUSKUS, C. & OROZCO, J. (2022), Electrochemical Genosensor for the Specific Detection of SARS-CoV-2. Talanta 245: 123482.

CHAIBUN, T., PUENPA, J., NGAMDEE, T., ..., S., POOVORAWAN, Y., LEE, S. Y. & LERTANANTAWONG, B. (2021), Rapid Electrochemical Detection of Coronavirus SARS-CoV-2. Nature Communications 12: 802.

CHEN, X., WU, G., CAI, Z., OYAMA, M. & CHEN, X. (2014), Advances in Enzyme-Free Electrochemical Sensors for Hydrogen Peroxide, Glucose, and Uric Acid. Microchimica Acta 181: 689-705.

CUNNINGHAM, J. C., BRENES, N. J. & CROOKS, R. M. (2014), Paper Electrochemical Device for Detection of DNA and Thrombin by Target-Induced Conformational Switching. Analytical Chemistry 86(12): 6166-6170.

DU, Y., LIM, B. J., LI, B., JIANG, Y. S., SESSLER, J. L. & ELLINGTON, A. D. (2014), Reagentless, Ratiometric Electrochemical DNA Sensors with Improved Robustness and Reproducibility. Analytical Chemistry 86(15): 8010-8016.

ERDEM, Ö., DERIN, E., SAGDIC, K., YILMAZ, E.G. & INCI, F. (2021), Smart Materials-Integrated Sensor Technologies for COVID-19 Diagnosis. Emergent Materials 21: 1-17.

FELIX, F. S. & ANGNES, L. (2018), Electrochemical Immunosensors – A Powerful Tool for Analytical Applications. Biosensors and Bioelectronics 102: 470-478.

FENDI, F. W. S., MUKHTAR, W. M. & ABDULLAH, M. (2023), Surface Plasmon Resonance Sensor for COVID-19 Detection: A Review on Plasmonic Materials. Sensors and Actuators A: Physical 362: 114617.

GARG, M., CHATTERJEE, M., SHARMA, A.L. & SINGH, S. (2020), Label-Free Approach for Electrochemical Ferritin Sensing Using Biosurfactant Stabilized Tungsten Disulfide Quantum Dots. Biosensors and Bioelectronics 151: 111979.

GARG, M., SHARMA, A.L. & SUMAN SINGH, S. (2021), Advancement in Biosensors for Inflammatory Biomarkers of SARS-CoV-2 during 2019-2020. Biosensors and Bioelectronics 171: 112703.

GOWRI, A., ASHWIN KUMAR, N. & SURESH ANAND, B.S. (2021), Recent Advances in Nanomaterials Based Biosensors for Point of Care (PoC) Diagnosis of COVID-19 – A Minireview. Trends in Analytical Chemistry 137: 116205.

GRIFONI, E., VALORIANI, A., CEI, F., ..., LANDINI, G., VANNI, S. & MASOTTI, L. (2020), Interleukin-6 as Prognosticator in Patients with COVID-19. Journal of Infection 81(3): 452-482.

HWANG, C., PARK, N., KIM, E. S., ..., PARK, S., KIM, N. Y. & KIM, J. H. (2021), Ultra-Fast and Recyclable DNA Biosensor for Point-of-Care Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19). Biosensors and Bioelectronics 185: 113177.

LI, Y., CHEN, J., WEI, J., ..., YU, L., DING, D. & YANG, Y. (2023), Metallic Nanoplatforms for COVID-19 Diagnostics: Versatile Applications in the Pandemic and Post-Pandemic Era. Journal of Nanobiotechnology 21: 255.

KHAN, M.A. & MUJAHID, M. (2020), Recent Advances in Electrochemical and Optical Biosensors Designed for Detection of Interleukin 6. Sensors (Basel) 20(3): 646.

KUDR, J., MICHALEK, P., ILIEVA, L., ADAM, V. & ZITKA, O. (2021), COVID-19: A Challenge for Electrochemical Biosensors. Trends in Analytical Chemistry 136: 116192.

LIPPI, G. & PLEBANI, M. (2019), Procalcitonin in Patients with Severe Coronavirus Disease (COVID-19): A Meta-Analysis. Clinica Chimica Acta 505: 190-191.

LA, M. (2020) Electrochemical, Electrochemiluminescent and Photoelectrochemical Immunosensors for Procalcitonin Detection: A Review; International Journal of Electrochemical Sciences 15: 6436-6447.

LU, R., ZHAO, X., LI, J., ..., CHEN, W., SHI, W. & TAN, W. (2020), Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. The Lancet 395: 565-574.

MA, Y., YANG, J., YANG, T., ..., WANG, M., HU, R. & YANG, Y. (2020), Electrochemical Detection of C-Reactive Protein Using Functionalized Iridium Nanoparticles/Graphene Oxide as a Tag. RSC Advances 10 (16): 9723-9729.

MADDALI, H., MILES, C.E., KOHN, J. & O'CARROLL, D.M. (2021), Optical Biosensors for Virus Detection: Prospects for SARS-CoV-2/COVID-19. ChemBioChem 22(7): 1176-1189.

MAHARI, S., ROBERTS, A., SHAHDEO, D. & GANDHI, S. (2020), eCovSens-Ultrasensitive Novel In-House Built Printed Circuit Board Based Electrochemical Device for Rapid Detection of nCOVID-19 Antigen, a Spike Protein Domain 1 of SARS-CoV-2. bioRxiv 2020.04.24.059204.

MALLA, P., LIU, C.-H., WU, W.-C., KABINSING, P. & SREEARUNOTHAI, P. (2023), Synthesis and Characterization of Au-Decorated Graphene Oxide Nanocomposite for Magneto-Electrochemical Detection of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Gene. Talanta 262: 124701.

MATTIOLI, I.A., HASSAN, A., OLIVEIRA, O.N. JR. & CRESPILHO, F.N. (2020), On the Challenges for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on a Review of Current Methodologies. ACS Sensors 5(12): 3655-3677.

MCBRIDE, R., VAN ZYL, M. & FIELDING, B. C. (2014), The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. Viruses 6(8): 2991-3018.

MIAO, Y., OUYANG, L., ZHOU, S., ..., YANG, Z., XIAO, M. & OUYANG, R. (2014), Electrocatalysis and Electroanalysis of Nickel, Its Oxides, Hydroxides and Oxyhydroxides toward Small Molecules. Biosensors and Bioelectronics 53: 428-439.

NAGEL, B., DELLWEG, H. & GIERASCH, L. M. (1992), Glossary for Chemists of Terms Used in Biotechnology (IUPAC Recommendations 1992). Pure and Applied Chemistry 64(1): 143-168.

NISHIMURA, K., KITAZAWA, H., KAWAHATA, T., ..., KOIKE, S., ISOBE, M. & KUROSAWA, N. (2023), The Development of a Highly Sensitive and Quantitative SARS-CoV-2 Rapid Antigen Test Applying Newly Developed Monoclonal Antibodies to an Automated Chemiluminescent Flow-Through Membrane Immunoassay Device. BMC Immunology 24(1): 34.

ORTEGA, F. (2006), Biosensores y biochips. Herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. pp. 1-140. Ed. Real Academia Nacional de Farmacia. ISBN 978-84-938172-6-8.

PANG, S., YU, H., ZHANG, Y., JIAO, Y., ..., WANG, M., ZHANG, H. & LIU, A. (2024) Bioscreening Specific Peptide-Expressing Phage and Its Application in Sensitive Dual-Mode Immunoassay of SARS-CoV-2 Spike Antigen. Talanta 266: 125093.

PARK, E., CHOI, S. Y., KIM, J., HILDEBRANDT, N., LEE, J. S. & NAM, J.-M. (2023), Nanotechnologies for the Diagnosis and Treatment of SARS-CoV-2 and Its Variants. Small Methods 7(7): 2300034.

PARK, I., LIM, J., YOU, S., ..., STEWART DE RAMIREZ, S.A., VALERA, E. & BASHIR, R. (2021), Detection of SARS-CoV-2 Virus Amplification Using a Crumpled Graphene Field-Effect Transistor Biosensor. ACS Sensors 6(12): 4461-4470.

PENG, Y., PAN, Y., SUN, Z., ..., YI, Y., YANG, J. & LI, G. (2021), An Electrochemical Biosensor for Sensitive Analysis of the SARS-CoV-2 RNA. Biosensors and Bioelectronics 186: 113309.

PINK, I., RAUPACH, D., FUGE, J., ..., HOEPER, M.M., WELTE, T. & RADEMACHER, J. (2021), C-Reactive Protein and Procalcitonin for Antimicrobial Stewardship in COVID-19. Infection 49(5): 935-943.

RASHED, M. Z., KOPECHEK, J. A., PRIDDY, M. C., ..., N., VALDEZ, J., FLYNN, J. & WILLIAMS, S. J. (2021), Rapid Detection of SARS-CoV-2 Antibodies Using Electrochemical Impedance-Based Detector. Biosensors and Bioelectronics 171: 112709.

RAZIQ, A., KIDAKOVA, A., BOROZNJAK, R., REUT, J., ÖPIK, A. & SYRITSKI, V. (2021), Development of a Portable MIP-Based Electrochemical Sensor for Detection of SARS-CoV-2 Antigen. Biosensors and Bioelectronics 178: 113029.

RONKAINEN, N. J., HALSALL, H. B. & HEINEMAN, W. R. (2010), Electrochemical Biosensors. Chemical Society Reviews 39(5): 1747-1763.

SENGUPTA, J. & HUSSAIN, C.M. (2021), Graphene-Based Field-Effect Transistor Biosensors for the Rapid Detection and Analysis of Viruses: A Perspective in View of COVID-19. Carbon Trends 2: 100011.

SEO, G., LEE, G., KIM, M.J., ..., KIM, B.T., PARK, E.C. & KIM, S.I. (2020), Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. ACS Nano 14(4): 5135-5142.

SHEN, J., LI, Y., GU, H., XIA, F. & ZUO, X. (2014), Recent Development of Sandwich Assay Based on the Nanobiotechnologies for Proteins, Nucleic Acids, Small Molecules, and Oons. Chemical Reviews 114(15): 7631-7677.

SIMON, D. T., GABRIELSSON, E. O., TYBRANDT, K. & BERGGREN, M. (2016), Organic Bioelectronics: Bridging the Signaling Gap between Biology and Technology. Chemical Reviews 116(21): 13009-13041.

SONG, Z., MA, Y., CHEN, M., AMBROSI, A., DING, C. & LUO, X. (2021), Electrochemical Biosensor with Enhanced Antifouling Capability for COVID-19 Nucleic Acid Detection in Complex Biological Media. Analytical Chemistry 93(14): 5963-5971.

TAMBORELLI, A., MUJICA, M. L., GALLAY, P., ..., RUBIANES, M. D., DALMASSO, P. & RIVAS, G. (2023), Biosensing Strategies for the Detection of SARS-CoV-2 Nucleic Acids. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 232: 115370.

TRAN, V.V., TRAN, N.H.T., HWANG, H.S. & CHANG, M. (2021), Development Strategies of Conducting Polymer-Based Electrochemical Biosensors for Virus Biomarkers: Potential for Rapid COVID-19 Detection. Biosensensors and Bioelectrononics 182: 113192.

TURNER, A.P.F., KARUBE, I. & WILSON, G.S. (1987), Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, Oxford. 770 p.

VADLAMANI, B. S., UPPAL, T., VERMA, S. C. & MISRA, M. (2020), Functionalized TiO_2 Nanotube-Based Electrochemical Biosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. Sensors 20: 5871.

VELLAS, C., DIMEGLIO, C., JONCOUR, E., ..., MIGUERES, M., KAMAR, N. & IZOPET, J. (2023), Evaluation of Two Anti-SARS-CoV-2 Antibody Immunoassays for Monitoring Patients on Pre-Exposure Prophylaxis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 107(4): 116071.

WALCARIUS, A., MINTEER, S. D., WANG, J., LIN, Y. & MERKOÇI, A. (2013), Nanomaterials for Bio-Functionalized Electrodes: Recent Trends. Journal of Materials Chemistry B 1: 4878-4908.

WANG, J. (2006), Analytical Electrochemistry. Hoboken, N.J.: Wiley-VCH.

YOUSEFI, H., MAHMUD, A., CHANG, D., ..., RINI, J. M., SARGENT, E. H. & KELLEY, S. O. (2021),

Detection of SARS-CoV-2 Viral Particles Using Direct, Reagent-Free Electrochemical Sensing. Journal of the American Chemical Society 143(4): 1722-1727.

ZHANG, A. & LIEBER, C. M. (2016), Nano-Bioelectronics. Chemical Reviews 116(1): 215-257.

ZHANG, S., GERYAK, R., GELDMEIER, J., KIM, S. & TSUKRUK, V. V. (2017), Synthesis, Assembly, and Applications of Hybrid Nanostructures for Biosensing. Chemical Reviews 117(20): 12942-13038.

ZHU, C., YANG, G., LI, H., DU, D. & LIN, Y. (2015), Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Nanomaterials and Nanostructures. Analytical Chemistry, 87(1): 230-249.

ZHOU, B., SHE, J., WANG, Y. & MA, X. (2020), Utility of Ferritin, Procalcitonin, and C-Reactive Protein in Severe Patients with 2019 Novel Coronavirus Disease. Research Square; https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-18079/v1

Capítulo XVII

Algunos avances recientes y tendencias emergentes en métodos analíticos para COVID-19

Julia Martín Bueno, Noelia Tena Pajuelo y Agustín García Asuero*
Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.
** Académico de número de la Academia Iberoamericana de Farmacia y de la Real Academia Nacional de Farmacia (IdE)*

INTRODUCCIÓN

Los virus representan algunas de las estructuras macromoleculares más hermosas presentes en la naturaleza (Asuero 2022; Wörner *et al.* 2021) y constituyen ejemplos destacados de simetría en biología (Dechant y Twarock 2021). Un virus es un organismo de estructura muy sencilla, compuesto de proteínas y ácidos nucleicos, y capaz de reproducirse solo (Rabadan 2020) en el seno de células vivas específicas, utilizando su metabolismo. Los virus son por tanto parásitos intracelulares obligatorios (Popovic 2023) que requieren un huésped adecuado para la replicación. Los virus modifican constantemente su composición genética de forma inherentemente impredecible, como un mecanismo para evadir el sistema inmunológico del huésped (Carabelli *et al.* 2023; Crespo-Bellido y Duffy 2023; Markov *et al.* 2023). Los virus están implicados en una carrera armamentística con las defensas innatas y adaptativas del huésped, y pueden causar enfermedades importantes, incluso la muerte.

Brote (RAE 2021) es la acción de brotar o empezar a manifestarse, y epidemia (RAE 2021) una enfermedad que se propaga durante algún tiempo por un país, afectando de forma simultánea a un elevado número de personas. La pandemia (RAE 2021) es una enfermedad epidémica que se extiende a muchos países o que ataca a casi todos los individuos de una localidad o región. En los últimos veinte años, los seres humanos hemos sido testigos (Bhalla *et al.* 2020) de cinco enfermedades pandémicas, todas ocasionadas por virus: i) el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) (China, 2002); ii) la gripe de los cerdos (gripe A, H1N1) (Canadá, 2009) iii) el ébola (EVE) (Guinea, 2014); iv) el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) (Arabia Saudí, 2012), y v) la enfermedad pulmonar causada por el SARS-CoV-2 (fig. 1), a la que la Organización Mundial de la Salud (OMS) da el 11 de febrero de 2020 el nombre de la COVID-19 (reconociéndola como pandemia el 11 de marzo de 2020).

La aparición periódica de nuevos coronavirus en humanos (*e. g.* SARS-CoV, MERS, SARS-CoV-2) se atribuye principalmente a su amplia distribución y alta prevalencia, elevada diversidad genética y frecuentes recombinaciones genómicas y actividades de interfaz humano-animal (Carabelli *et al.* 2023; Cui *et al.* 2023; Shafaati *et al.* 2023; Williams *et al.* 2023). Otros coronavirus como HKU1, NL63, OC43 y 229E son endémicos y se asocian con enfermedades respiratorias leves en individuos sanos. El SARS-CoV-2 es la séptima especie de la familia *Coronaviradae* que infecta a ambos animales y personas. Los virus representan más de la mitad de los brotes de enfermedades infecciosas que han afectado a la humanidad. La historia de las pandemias virales (Graham y Sullivan 2018; John *et al.* 2023) originadas desde 1918 se muestran en la tabla 1 (Nii-Trebi *et al.* 2023; Valipour *et al.* 2023). En los últimos cien años han surgido más de diez, la mayor parte propagadas por la circulación de los viajeros (Bauer 2023), afectando además a aquellos que se dirigían a los destinos en los que se habían producido los brotes. Los virus de ARN pertenecientes a la familia *Coronaviridae* han sido los más prevalentes en las últimas dos décadas (Valipour *et al.* 2023) desencadenándose una pandemia aproximadamente cada diez años.

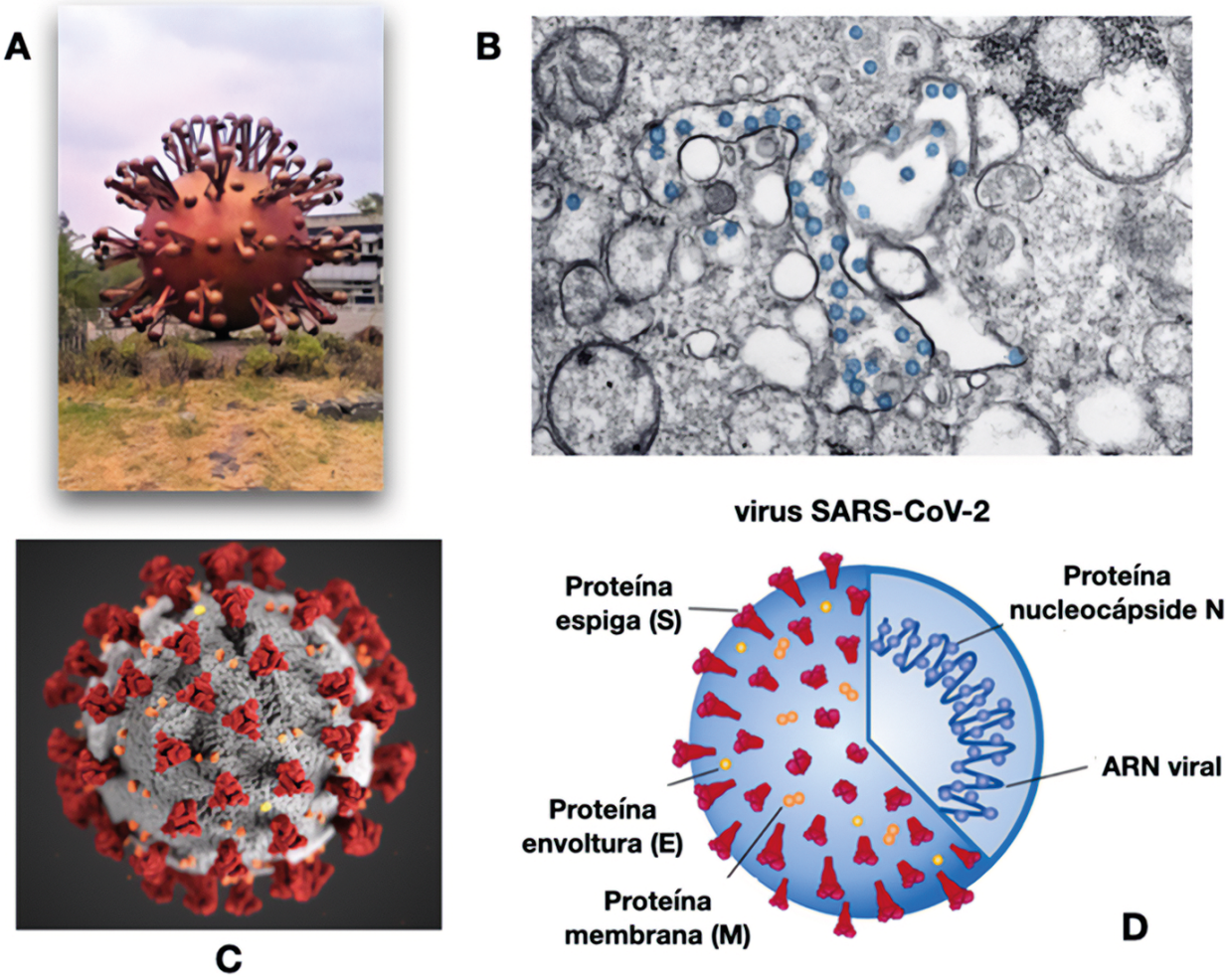


Figura 1. A) Escultura de un coronavirus ubicada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (México), https://es.wikipedia.org/wiki/COVID-19; B) Visualización del SARS-Cov-2 con el microscopio electrónico de transmisión (ETM), https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23354; C) Imagen que revela la ultraestructura morfológica del SARS-CoV-2, https://phil.cdc.gov//PHIL_Images/23311/23311.tif; D) Esquemas del SARS-CoV-2 incluyendo el ARN y las proteínas estructurales (Lukas *et al.* 2020). Fuente: American Chemical Society (ACS)

Tabla 1. Historia de las pandemias virales desde 1918, origen y número de muertos

Año	Nombre de la pandemia	Fuente sospechosa	Número de muertos
1918	Gripe española (virus H1N1)	Cerdos	20-100 millones
1957	Gripe asiática (virus H2N2)	Cerdos/Pollos/Patos	0,7-1,5 millones
1960	HIV (virus AIDS)	Chimpancés	35 millones
1968	Gripe de Hong-Kong (Virus H3N2)	Cepa de H2N2	1 millón
1974	Viruela	Virus de la viruela	500 millones
2002	SARS (coronavirus)	Murciélagos/ Civetas	774
2009	Gripe de la cerda (Virus H1N1)	Cerdos	284 mil
2012	MERS (coronavirus)	Murciélagos/ Civetas	850
2014	Virus del ébola	Animales salvajes	11,3 mil
2015	Virus del Zika (ZIKV)	Mosquitos	N/A
2019	COVID-19 (SARS-CoV-2)	Incierto	6,951,677

La COVID-19 no ha sido solo una emergencia médica causada por un virus entonces poco conocido (Bauer 2023). Culminó con restricciones y prohibiciones de movilidad (Gala *et al.* 2022) a través de fronteras internacionales que pronto se cerrarían, al igual que dentro de los propios países. La enfermedad ha impactado significativamente en la vida diaria (Abbas *et al.* 2023) incluida la salud pública mundial. El virus amenazó la supervivencia de una industria multimillonaria que existe (Bauer 2023) gracias a que las personas se desplazan, se congregan y se reúnen con otras personas en destinos de todo el mundo. Una lección clara que se desprende de los confinamientos es que exacerban las desigualdades que ya existen en la sociedad (Peeling y Sia 2023) al afectar en mayor grado y generar más inseguridad a quienes ya viven en la pobreza.

La COVID-19 es el desafío sanitario más imponente que ha afrontado la humanidad el siglo XXI. La enfermedad ha afectado a fecha de 17 de marzo de 2024 a un total de 774.954.393 millones de personas, habiéndose producido 7.040.264 muertes (WHO; https://covid19.who.int). Las consecuencias fisiológicas, socioeconómicas y políticas generadas han sido graves (Asuero 2020; Klein 2023, Nigg *et al.* 2023; Parlamento Europeo 2023) conduciendo a valiosas pérdidas económicas. La creciente frecuencia de aparición de brotes virales y los desafíos que plantean a la humanidad exigen la búsqueda continua de formas (Nii-Trebi *et al.* 2023) que permitan abordarlos con garantías en tiempo real. El intercambio rápido y coordinado de los resultados de investigación entre las comunidades científicas y los organismos de salud pública (Asuero 2020; Report 2023) es fundamental para el estudio eficaz de los virus. La COVID-19 ha demostrado claramente que el diagnóstico es crucial para el control de la enfermedad, especialmente en las primeras etapas de un brote (Escadafal *et al.* 2023), antes de que puedan implementarse vacunas y tratamientos.

Para una introducción al tema de la COVID-19 pueden consultarse los trabajos de Avendaño López (2020), Feng *et al.* (2020), Martin *et al.* (2021), Nii-Trebi *et al.* (2023), Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera (2020), Vindeirinho *et al.* (2022) y Udugama *et al.* (2020). La «Académie Nationale de Pharmacie» (2020; 2021) ha reivindicado el papel de la química en la pandemia.

1. AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DEL SARS-COV-2

Los patógenos virales pueden detectarse (Yadav *et al.* 2021) mediante métodos tradicionales (cultivo del virus y microscopía electrónica), métodos avanzados y rápidos (PCR y específicos de ARN no PCR), serológicos y biosensores. Los métodos de diagnóstico (fig. 2) han sido

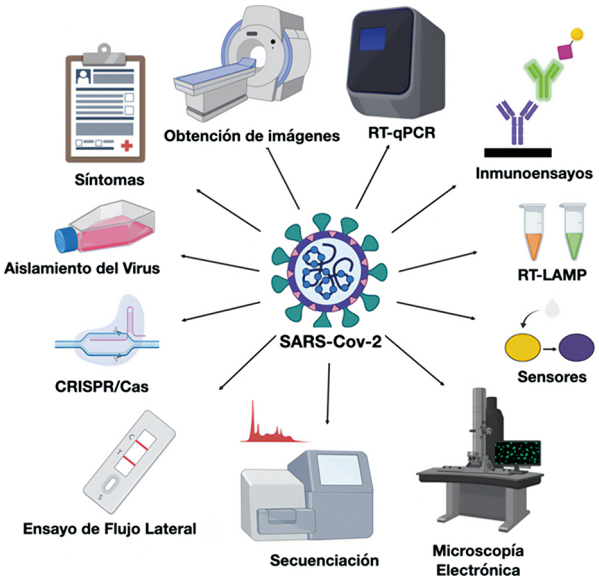


Figura 2. Métodos de diagnóstico de la COVID-19 (da Silva *et al.* 2020). Fuente: American Chemical Society (ACS)

objeto de numerosas revisiones (*e. g.* Dong *et al.* 2023; Irkham *et al.* 2023; Jain *et al.* 2023; Liu *et al.* 2023d; Martin *et al.* 2021; Peng *et al.* 2023; Sun *et al.* 2023; Wilner *et al.* 2023; Xang 2023) y de tratamiento somero en un capítulo previo. El microscopio electrónico de transmisión (Bhalla *et al.* 2020; Udugama *et al.* 2020) se usa para identificar la morfología del virus (fig. 1B) y a diferencia de otras técnicas de detección, no requiere el uso de reactivos específicos para el reconocimiento del agente patógeno. Las micrografías electrónicas del SARS-CoV-2 revelan un contorno esférico divergente con cierto grado de pleomorfismo, diámetros de virión que varían de 60 a 240 nm y picos distintivos de 9 a 12 nm, dando al virus la apariencia de una corona solar (fig. 1B y 1C), de ahí el nombre, derivado de la palabra latina corona.

El aislamiento del virus en cultivo celular (Chen *et al.* 2023a; da Silva *et al.* 2020; Yadav *et al.* 2021) se considera el estándar de oro y el método más sensible para identificar virus emergentes. Un sistema de cultivo celular simple es esencial para generar grandes cantidades de SARS-CoV-2 destinadas a la evaluación de la patogenicidad viral, la detección y pruebas de fármacos antivirales, el desarrollo y la preparación de vacunas, y realización de análisis genómicos comparativos de virus aislados de diferentes regiones (Chen *et al.* 2020; Chen *et al.* 2023a).

El cultivo viral implica la inoculación de suspensiones virales de muestras clínicas en cultivos celulares, tales como VeroE6, Huh7 y células de epitelio humano, y amplificación del virus en dicho medio (Zhao *et al.* 2023b). Sin embargo, se trata de un procedimiento laborioso, que requiere un largo período de cultivo, de 3 a 7 días, equipo especializado, complejos protocolos con

elevados niveles de rigor y seguridad y buena destreza experimental, lo que lo hace inapropiado para el trabajo con gran cantidad de muestras. En situaciones pandémicas tales como la acontecida con la COVID-19 el diagnóstico rápido es esencial.

La secuenciación del genoma se utiliza para confirmar la identidad del virus y los datos de secuencia (Polatoglu *et al.* 2023) ayudan a diseñar sondas y cebadores de PCR. El SARS-CoV tardó cinco meses en ser identificado. Las mismas técnicas permitieron (Chen *et al.* 2020; Burki 2023) identificar el SAR-CoV-2 en un corto período de tiempo. Como ocurre con otros coronavirus, el cultivo no es útil como técnica de diagnóstico, ya que el virus no se replica bien en las líneas celulares más usuales. Aunque lo hace en células del epitelio respiratorio humano y en líneas celulares Vero y LLC-MK2, la evidencia sugiere (Chen *et al.* 2023a; Dong *et al.* 2023) que Vero E6, una línea celular frecuentemente utilizada para cultivar SARS-CoV-2, no permite la propagación eficiente de nuevas variantes virales y desencadena una rápida adaptación del virus en cultivos celulares. Las líneas celulares Caco-2/AT y HuH-6/AT producen reservas de virus altamente concentradas y son más sensibles que las células Vero E6 a la hora de recuperar el SARS-CoV-2 de muestras clínicas. En adición, las células Caco-2/AT proporcionan una plataforma sólida para producir SARS-CoV-2 recombinante genéticamente confiable a través de un sistema de genética inversa.

La práctica requiere (da Silva *et al.* 2020; Feng *et al.* 2020) el uso de laboratorios de nivel 3 de bioseguridad (BSL3), debido al elevado riesgo del personal, aunque los análisis de muestras de ARN virales requieren tan solo un nivel de bioseguridad 2 (BSL2). El nivel de bioseguridad o BSL es un conjunto de precauciones de biocontención necesarias para aislar agentes biológicos peligrosos (Reilly 2019) en un laboratorio de investigación o fabricación cerrado. Estos niveles de protección son necesarios para salvaguardar al personal del laboratorio y el entorno circundante. Los niveles de contención varían (CDC-NIH 2020) desde el nivel 1 de bioseguridad más bajo (BSL-1) hasta el nivel 4 más alto (BSL-4). Estos niveles, del 1 al 4, se clasifican según la letalidad de los agentes u organismos con los que se está trabajando en el laboratorio.

La construcción de laboratorios de alta seguridad para el estudio de patógenos peligrosos está en auge (Morin 2023) unos años después del brote del virus, y requieren de una vigilancia constante y estricta. Su número había aumentado ya tras los ataques con ántrax de 2001 en los Estados Unidos y el brote de SARS de 2003 en Asia. Estos laboratorios (NIH CDC 2020) se denominan de nivel 4 de bioseguridad, BSL-4, o P4 en Francia. En marzo de 2023 existían unos 70 laboratorios distribuidos en 27 países, aunque al menos otros siete están listos para unirse al club. La mayoría de los laboratorios en construcción o planificados (Morin 2023) se encuentran en países que no contaban con ese tipo de instalaciones, y que en ocasiones carecen del marco regulatorio para realizar actividades con patógenos peligrosos. Existen riesgos de seguridad y de doble uso (investigaciones civiles con aplicaciones militares, y/o terroristas o experiencias destinadas a hacer que los virus y las bacterias sean más patógenos o transmisibles, *i.e.* de ganancia de función) asociado con estas actividades (Cornish *et al.* 2021; Dieulis y Giordano 2023; Morin 2023). Es por lo que se requiere llevar a cabo inspecciones *in situ* y evaluaciones para mejorar la supervisión, así como la elaboración de estándares actualizados de bioseguridad y bioprotección (USHCOA 2023). Esto supone la garantía de una mejor preparación y de respuesta más eficaz ante una próxima emergencia de salud pública. El concepto de «bioseguridad (biosafety)» se define como el conjunto de medidas centradas en la prevención de una liberación involuntaria de agentes biológicos peligrosos, y «bioprotección (biosecurity)» como todas las medidas centradas en bloquear una liberación intencional de agentes biológicos (Rutjes *et al.* 2023).

2. GENOMA DEL SARS-COV-2

El genoma del SARS-CoV-2 de ≈30 kb, formado por una cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva +ssARN comprende 10 genes, que producen 26 proteínas, la mayoría funcionales, incluidas proteasas, ARN polimerasa, y factores asociados necesarios para la copia del genoma (Islam 2024; Kim y Lee 2022; Nguyen *et al.* 2023; Schuster *et al.* 2021; Vásquez y Orozco 2023), una corrección de pruebas de exonucleasa, y varias proteínas no estructurales (nsp). Los genes restantes codifican predominantemente los cuatro componentes (fig. 1D) estructurales y funcionales del virus: i) el pico exterior trimérico de glicoproteína (S) transmembrana (proteína espiga), sito en la superficie del virus, que se une al receptor (RBD: *receptor binding domain*) de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) para permitir la entrada celular (Nguyen *et al.* 2023). Recientemente se ha demostrado la implicación de otros receptores, entre ellos uno tirosina kinasa (AXL) tan fuerte como el ACE2; silenciándose AXL se reduce significativamente (Saygili *et al.* 2023) la infección pulmonar por SARS-CoV-2; ii) una nucleo(fosfo)proteína (N), la más abundante, altamente inmunogénica, que se une directamente al ácido nucleico (ubicado en la cavidad del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico) que proporciona estabilidad, y que raramente cambia con la progresión de la enfermedad; iii) una proteína de envoltura (E) que tiene aspectos tanto estructurales como funcionales. Es el componente

más pequeño del SARS-CoV-2, pero es crucial para el desarrollo y la madurez viral, implicada en el ensamblaje del virus y en la patogénesis; y iv) una proteína de membrana dimérica (M), la más físicamente compleja, que forma la capa externa del virus. Las proteínas M y E forman una bola que protege el núcleo genético del ARN, que está envuelto por la proteína N en una conformación tipo cuentas de collar (beads-on-a-string). Estas cuatro proteínas estructurales S, N, E y M, son las proteínas más abundantes en el virus; se estima que existen ~1000 y ~300 copias por virión para las proteínas N y S, respectivamente. La proteína S se compone de dos subunidades: la S1 N-terminal y la S2 C-terminal. El dominio N-terminal (NTD) y el RBD se sitúan en la unidad S1. Las proteínas E y M son difíciles de extraer, detectar e identificar debido a que son relativamente cortas y están estrechamente unidas a la membrana, lo que resulta en un número escaso de métodos para su detección.

3. MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL SARS-COV-2

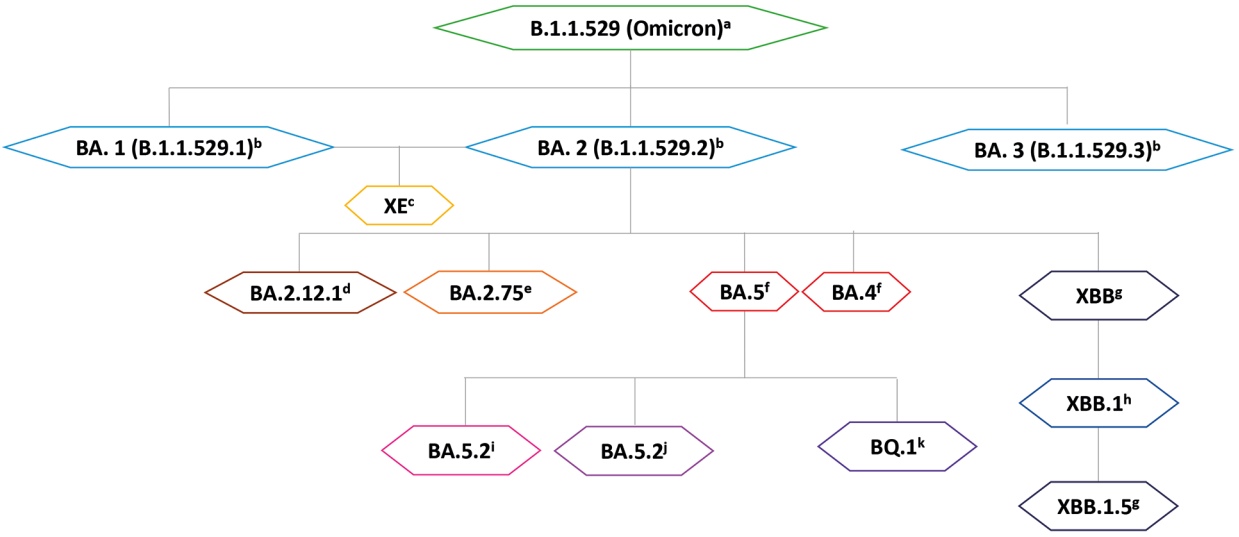
Los avances producidos en el campo de la química analítica, la biología molecular y los biosensores han hecho posible (Cheng *et al.* 2023; Dong *et al.* 2023; Kumar *et al.* 2023c; Le 2021; Patel *et al.* 2023; Perveen *et al.* 2023; Polaroglu *et al.* 2023; Sharma *et al.* 2023; Xang *et al.* 2023) la detección de biomarcadores con unos niveles de resolución, precisión y sensibilidad, sin precedentes en clínica. Las técnicas y métodos puestos a punto han evolucionado hasta convertirse en plataformas y pruebas bien establecidas, que se aplican con carácter de rutina en muestras variadas, *e. g.* saliva, sangre, orina, heces y muestras de tejidos. El método estándar de oro para detectar el SARS-CoV-2 es la prueba de RT-PCR que es el método con mayor sensibilidad y especificidad y consiste (Martin *et al.* 2021; Wilner *et al.* 2023) en detectar ácidos nucleicos virales en la muestra respiratoria. Sin embargo, su limitación para ser aplicada (Fragkou *et al.* 2023; Salgado Fernandes *et al.* 2022; Seok *et al.* 2023) en puntos de atención (point of care testing, POC) ha motivado el desarrollo de otras pruebas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos.

Para mejorar la sensibilidad de estas pruebas, se deben identificar simultáneamente en una sola prueba múltiples cebadores diana (genes E, N y RdRp) creados específicamente (Martin *et al.* 2021) para la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa (RT-LAMP). Estos ensayos multiplexados dirigidos evitan el riesgo potencial de susceptibilidad debido a la variabilidad genética desconocida, monitorizando la variación genómica. Es necesario actualizar los bancos de datos con información sobre la diversidad genética del SARS-CoV-2, dada la naturaleza cambiante del virus, y la aparición de nuevas cepas (Carabelli *et al.* 2023; Chen *et al.* 2022; Chen *et al.* 2023b; Dubey *et al.* 2022; Liu *et al.* 2023b; Qin *et al.* 2024).

Las mutaciones adaptativas en el genoma relacionado con el virus, *e. g.* en la proteína S y en los dominios NTD y RBD (Gómez *et al.* 2021) pueden modificar su potencial patógeno. La aparición de nuevas variantes requiere una actualización continua de los métodos de detección (Li *et al.* 2023c; Liu *et al.* 2023b). Incluso la variación de un solo aminoácido puede alterar significativamente la capacidad del virus para evadir el sistema inmunológico y afectar a la eficacia de una vacuna contra el virus (Hillary y Cesar 2023). La diferenciación y detección de variantes se logra a menudo mediante la detección de mutaciones (dianas) que son específicas de la variante particular (Safari y Elahi 2022). La OMS ha clasificado estas variantes en variantes de interés (VOI, variants of interest), variantes bajo seguimiento (VUM, variants under monitoring) y variantes preocupantes (VOC, variants of concern). Una variante de interés del SARS-CoV-2 es una cepa de virus asociada con un aumento de parámetros relacionados con la salud pública, como la transmisibilidad, la patogenicidad, la gravedad de la presentación clínica, o el escape terapéutico. Una variante preocupante es una cepa asociada con cambios más drásticos en estos parámetros. Estas clasificaciones son fluidas a medida que surgen nuevas variantes y reemplazan a las previas existentes.

En mayo de 2021, la OMS asignó letras griegas para la denominación de VOC y VOI. Han surgido al menos 10 variantes importantes del SARS-CoV-2 debido a una mutación genética, un fenómeno frecuente entre los virus de ARN. Alfa, Beta, Gamma, Delta, Épsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota, Kappa, Lambda, Ómicron y neo-CoV-2 llegaron a convertirse en una grave amenaza para la salud pública. A partir del 15 de marzo de 2023, las letras griegas se asignan únicamente a los VOC, mientras que los VOI se designan utilizando sistemas de nomenclatura científica preestablecidos. Las variantes Delta y Ómicron (declarada COV por la OMS el 26 de noviembre de 2021) y sus sublinajes suponen un riesgo aún mayor que otras variantes. Las variantes de Ómicron (fig. 3) (Li *et al.* 2024b), tienen más mutaciones en las proteínas S y de la nucleocápside N y varias decenas de mutaciones dentro de su genoma de RNA.

El RBD de la variante Ómicron tenía 10 alteraciones mientras que la variante Delta tenía 2; en la proteína S de Ómicron se producen múltiples mutaciones, más de 30, el doble en comparación con la variante Delta (Kumar *et al.* 2022a). Las superficies de unión y los cambios locales en la estructura de la espiga de Ómicron inducidos por mutaciones observados (Fan *et al.* 2022) por microscopía crioelectrónica (crio-EM) interfieren en el reconocimiento



a. Noviembre 2021, World Health Organisation. Who.int.
b. Noviembre 2021, Journal of Medical Virology 2022, 94, 1808-1810.
c. Marzo 2022, The Innovation 2022, 3, 100248.
d. Abril 2022, Department's Wadsworth Center Identifies.
e. Junio 2022, Infection and Drug Resistance 2022, 15, 6317-6330.
f. Diciembre 2021, Nature Medicine 2022, 28, 1785-1790.
g. Agosto 2022, International Journal of Infectious Diseases 2023, 128, 307-309.
h. Agosto 2022, International Journal of Surgery 2023, 109, 1041-1043.
i. Julio 2022, China CDC Weekly 2022, 4, 557-668.
j. Diciembre 2022, Nature Medicine, 2023, 29, 579-582.
k. Octubre 2022, Wiki.

Figura 3. Línea de tiempo que ilustra la aparición o detección inicial de variantes o subvariantes significativas de Ómicron (basado en Li *et al.* 2024)

de anticuerpos, base de la evasión inmune. Más recientemente han surgido y se han expandido sublinajes recombinantes que surgen (Meumann y Robson 2023) del intercambio de material genético entre cepas XBB, XBF, XBC y otras. La OMS está revisando su sistema de clasificación para reflejar mejor el panorama actual dominado por los descendientes de Ómicron (WHO 2023). Una nueva variante, dominante, la EG.5 (Eris) ha sido reportada (Parums 2023) por la OMS el 17 de febrero de 2023 y designada VUM el 19 de julio de 2023.

La discriminación de variantes se basa principalmente en la identificación de mutaciones específicas de variantes en el gen de la proteína S. Tan solo la variante Ómicron pasó a considerarse VOC; las variantes Beta, Alfa, Gamma y Delta son variantes que circulaban anteriormente. A fecha de 15 de diciembre de 2023 no existen variantes que satisfagan los criterios de VOC (https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern). Una subvariante de Ómicron JN.1 estrechamente relacionada con la variante BA.2.86 (con un solo cambio en la proteína espiga), a la que se ha denominado Pirola (Looi 2023a; Looi 2023b: Mahase 2023), detectada por primera vez en EEUU en septiembre de 2023, ha sido clasificada de interés por la OMS, no existiendo evidencia de un mayor riesgo de salud pública en relación con otras variantes circulantes en la actualidad.

La propagación de variantes preocupantes (VOC) del SARS-CoV-2 es de gran importancia ya que los cambios genéticos pueden aumentar la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad y reducir la eficacia de la vacuna. Además, estos cambios pueden provocar el fracaso de las medidas de diagnóstico. Por tanto, reviste gran importancia el desarrollo de métodos rápidos de diagnóstico específicos de variantes del SARS-CoV-2 acordes con su modificación genética. La secuenciación genética es el método de referencia para discriminar entre variantes. Sin embargo, lleva mucho tiempo (varios días) y es caro. Existen algunas tecnologías disponibles para su detección. La eficacia de estas pruebas depende en gran medida (Valipour *et al.* 2023) de la flexibilidad para reconocer la selección de elementos como anticuerpos monoclonales (mAbs), miniaglutinantes de anticuerpos, nanocuerpos y aptámeros que se utilizan para la detección de antígenos. La insuficiencia de las herramientas de diagnóstico convencionales en términos de procesos de diagnóstico de laboratorio complejos y que requieren mucho tiempo es un desafío importante para la atención médica.

4. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES DEL SARS-COV-2: ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Las proteínas son las biomoléculas que cubren mejor el espacio existente entre la información genómica y las funciones biológicas y los fenotipos de enfermedades (Birhanu 2023). La detección de cantidades mínimas de proteínas virales constituye uno de los retos de la química analítica actual (Feng *et al.* 2020), requiriendo la aplicación de técnicas ultrasensibles, ya que las proteínas, a

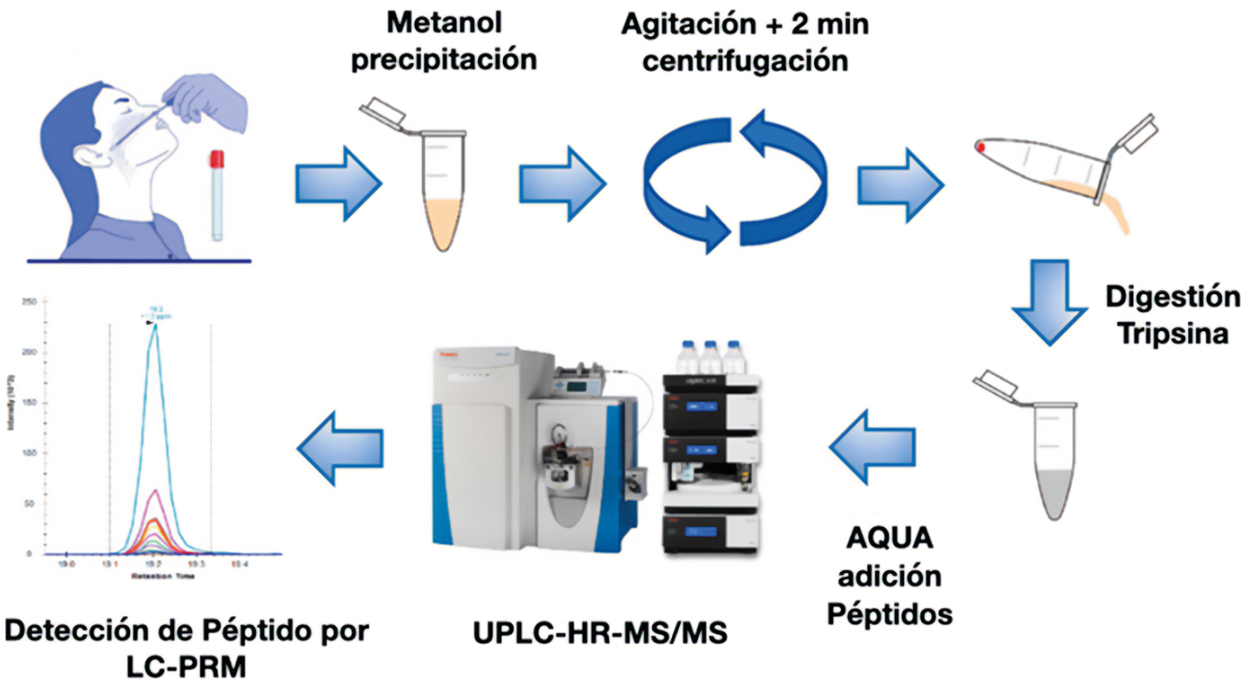


Figura 4. Diagrama de flujo para la detección y cuantificación de las proteínas estructurales del SARS-CoV-2 mediante LC MS/MS (Saadi *et al.* 2021). Fuente: American Chemical Society (ACS).

diferencia de los ácidos nucleicos virales, no son susceptibles de ser amplificadas directamente. Las proteínas poseen un enorme potencial como biomarcadores en la detección y el diagnóstico de enfermedades, ya que pueden detectarse a bajos niveles en muestras de sangre, lo que las hace ideales para el diagnóstico temprano. El conocimiento de biomarcadores significativos de proteínas es crítico no solo para tratar la COVID-19 causado por el coronavirus sino también de cara a afrontar futuras pandemias y otras enfermedades, al detectarse por LC-MS/MS (Gajula *et al.* 2023) en los primeros estadios. Los métodos basados en LC-MS/MS son útiles en la separación e identificación de bajos contenidos de proteínas virales (Zhou *et al.* 2023c). El desarrollo de espectrometría de masas de elevada resolución (HR-MS), y métodos multi óhmicos como la genómica, metabolómica y proteómica han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico, clasificación, terapia e investigación de mecanismos patogénicos (Zhou *et al.* 2023c).

La naturaleza no invasiva de los análisis de sangre para medir biomarcadores de proteínas, combinada con su consistencia y fiabilidad a la hora de proporcionar resultados los convierte en una valiosa herramienta para monitorizar la progresión de una enfermedad y evaluar la eficacia de los tratamientos. Se ha explorado el potencial de los biomarcadores plasmáticos con objetivos diagnósticos y terapéuticos, en respuesta (Zhao *et al.* 2023a) a la pandemia de la COVID-19 mediante mediciones ultrarrápidas de espectrometría de masas de alta resolución (HR), lo que permite un mejor seguimiento y tratamiento de los pacientes. La espectrometría de masas de alta resolución HR-MS constituye una herramienta prometedora para la detección y control de enfermedades a gran escala durante emergencias de salud pública, siendo su potencial impacto significativo.

Tanto la espectrometría de masas (MS) como las técnicas proteómicas están llamadas por tanto a desempeñar un papel importante en la caracterización y medida (fig. 4) cuantitativa de proteínas virales (Amiri-Dashatan *et al.* 2022; Gowda *et al.* 2023; Lazari *et al.* 2023; Lima *et al.* 2022; Wong *et al.* 2022). La MS detecta de forma robusta las proteínas estructurales N, S y M del SARS-CoV-2. Los últimos años han sido especialmente interesantes (Do *et al.* 2022; Gowda *et al.* 2023; Lima *et al.* 2022; Wörner *et al.* 2021; Zhao *et al.* 2023b) para la virología estructural basada en la MS, en gran parte debido a los avances revolucionarios en la MS nativa de alta resolución, los enfoques de partículas únicas y los nuevos desarrollos en la glicoproteómica, así como el papel cada vez relevante de la MS en los enfoques de biología estructural integradora.

Los enfoques proteómicos basados en MS, como la cromatografía líquida (LC)-MS (Gajula *et al.* 2023) y la desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI)-MS (de Almeida *et al.* 2022; Do *et al.* 2022) se han utilizado con éxito como herramientas de diagnóstico para investigar infecciones virales emergentes y reemergentes como la debida al SARS-CoV-2 y su

patogénesis en entornos clínicos (Wong *et al.* 2022), llegando a analizarse 500 muestras/día, con límites de detección de SARS-CoV-2 de hasta 500 fM (fentomolar), correspondiente a un valor Ct (cycle threshold; valor umbral del número de ciclos) de 22.

También ha sido objeto de aplicación la MS en tándem triple cuadrupolo en modo de operación de monitoreo de reacciones múltiples (Roquencourt *et al.* 2023; Zhao *et al.* 2023b). Estos estudios demuestran que la MS dadas las ventajas de alta velocidad, sensibilidad y especificidad podría convertirse (Wong *et al.* 2022) en un excelente método complementario a la PCR para el diagnóstico de COVID-19, aliviando en momentos críticos la carga de trabajo de los laboratorios clínicos que realizan pruebas de RT-PCR. La MS proporciona además información adicional, *e. g.* proteínas, péptidos, ARN y metabolitos en diferentes tipos de muestras como hisopos nasofaríngeos (Yoshinari *et al.* 2022), gárgaras, suero salival, aliento (Roquencourt *et al.* 2023), etc. Los métodos desarrollados pueden modificarse con facilidad para detectar nuevas variantes del SARS-CoV-2 recurriendo a péptidos diana mutados como identificadores de las variantes del SARS-CoV-2, sin requerir una investigación adicional exhaustiva.

Estudios recientes (Lazari *et al.* 2023) han demostrado la eficacia de los biomarcadores proteicos basados en MS con la ayuda de algoritmos de aprendizaje automático para el diagnóstico del SARS-CoV-2 con una precisión del 93,9 %. La MS por ionización de muestreo directo que utiliza sistemas de pulverización en papel y un manipulador robótico minimiza el tiempo dedicado a la preparación de la muestra permitiendo un diagnóstico rápido de cientos de muestras/día de SARS-CoV-2 en grandes cohortes de muestras clínicas (Lazari *et al.* 2023).

Laboratorios académicos y empresas tecnológicas han establecido un consorcio Cov-MS para lograr conseguir la transferencia de la metodología de laboratorio a la práctica clínica. El ensayo Cov2MS se desarrolló para diagnosticar el SARS-CoV-2 en hisopos nasofaríngeos, saliva y plasma sanguíneo con una mayor sensibilidad acreditando su reproducibilidad en diferentes laboratorios. El ensayo se puede utilizar para monitorear docenas de patógenos en muestras agrupadas de pacientes en sistemas de alerta temprana de epidemias y pandemias inminentes y en el posterior desarrollo rápido de vacunas y diagnósticos.

Se ha desarrollado un método de diagnóstico de alta sensibilidad y alta selectividad (Zhou *et al.* 2023c) de identificación específica de traza (0,01 pg) de glicoproteína S1 del SARS-CoV-2 en un pseudovirus de pico, basado en el ensayo de monitoreo de reacciones paralelas (PRM) dirigido de ocho péptidos seleccionados, sin interferencia de otras proteínas estructurales, tecnología que podría extenderse a otros patógenos, ajustando los péptidos específicos de adquisición de datos de la espectrometría de masas. Una plataforma de elevada eficiencia (Zhao *et al.* 2023b) que combina ensayos con 17 regiones genéticas altamente conservadas como dianas con espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS), permite apuntar a 14 sitios de mutación diferentes del gen Spike (ayudando así a la respuesta continua a la variación viral), aplicándose en muestras de hisopos nasofaríngeos o muestras clínicas de esputo con idéntico resultado al de la RT-qPCR.

Una metodología basada en espectrometría de masas para el diagnóstico del SARS-CoV-2 propagado en cultivo celular permite la identificación universal del SARS-CoV-2, así como la discriminación de variantes específicas (Feldberg *et al.* 2023). La identificación universal del SARS-CoV-2 se basa en marcadores conservados compartidos por todas las variantes, mientras que la identificación de variantes específicas se basa en marcadores específicos de cada variante, derivados principalmente de las proteínas virales de pico (S) y nucleocápside (N). La determinación de un conjunto específico de péptidos específicos de una variante dada transcurre en varias etapas: búsqueda «in silico» de péptidos obtenidos por proteólisis con tripsina específicos de la variante, digestión con tripsina de una variante del SARS-CoV-2 cultivada en células e identificación de estos marcadores mediante análisis HR-LC-MS/MS.

MALDI-MS es particularmente útil para la detección y diferenciación (Lanyon *et al.* 2023) de virus respiratorios y otros virus, incluido el SARS-CoV-2, ya que proporciona un enfoque sensible y de rendimiento relativamente elevado en comparación con estrategias basadas en PCR. MALDI-MS tiene ventajas sobre los métodos de ionización por electropulverización (ESI)/cromatografía líquida (LC) debido a la velocidad de preparación y análisis de muestras, y su mayor tolerancia a sales, tampones y otros contaminantes biológicos comunes, evitando la pérdida de muestras del soporte cromatográfico. Cuando se acopla a espectrómetros de masas de alta resolución (HR), siendo posible detectar y también tipificar y subtipificar virus respiratorios utilizando huellas de masa «mass signatures», sin necesidad de secuenciación, en lo que se conoce como proteotipado «proteotyping». La detección MALDI-MS de péptidos proteolíticos derivados de la digestión de la proteína de pico ha permitido asignar con confianza cada una de las cinco variantes principales de interés del SARS-CoV-2 (Alfa, Beta, Gamma, Delta y Ómicron original) solo por masa (Lanyon *et al.* 2023).

Se ha aplicado el mapeo de masas mediante HR-MS con objeto de identificar y distinguir rápidamente (Lanyon

et al. 2023) las subvariantes de Ómicron en los linajes BA.1-BA.5. Las mutaciones proteicas específicas del linaje en la proteína de pico de la superficie dan lugar a biomarcadores peptídicos de masa única que pueden detectarse con confianza y sensibilidad con espectrometría de masas de alta resolución. Aquellos que se ionizan y detectan de manera más eficiente dentro de la subunidad S1 en formas recombinantes facilitan su detección en muestras clínicas que contienen otras proteínas y contaminantes virales del SARS-CoV-2.

Se ha puesto a punto un método MALDI-TOF MS, llamado matriz de mutación puntual (PMA, puntual mutation array), para identificar cuatro variantes de preocupación (COV) principales del SARS-CoV-2 incluyendo Alfa, Beta, Delta y Ómicron (denominado PMA-ABDO) y diferenciar la subvariante de Ómicron (es decir, PMA-Ómicron). PMA-ABDO y PMA-Ómicron constan de 24 y 28 sitios de mutación del gen Spike (Wacharapluedadee *et al.* 2023).

El análisis del aliento es una técnica no invasiva, en tiempo real, en el lugar de atención, basada en la detección de compuestos orgánicos volátiles. Los miles de compuestos identificados hasta la fecha en el aliento humano están relacionados con procesos fisiológicos y patológicos (por ejemplo, infecciones e inflamación). El análisis del aliento por espectrometría de masas mejorada con la aplicación de inteligencia artificial (A.I.), no invasivo y en tiempo real (Roquencourt *et al.* 2023) se trata de un método confiable, seguro, rápido, rentable y de alta resolución para la detección de la COVID-19. La respiración, como espejo de nuestro cuerpo, puede ser «the answer in the wind» (Beduk *et al.* 2021), y las herramientas de detección eficientes utilizadas para el análisis del aliento exhalado, se constituirán en el soporte de futuros diagnósticos, en especial tras la pandemia de la COVID-19.

Los lípidos son las principales biomoléculas del plasma humano observándose cambios significativos en los perfiles lipídicos (Dasgupta *et al.* 2023) antes y después de la infección por SARS-CoV-2. Como los lípidos son componentes estructurales, recursos energéticos y mediadores de señalización, desempeñan funciones metabólicas cruciales (Gowda *et al.* 2023) en las infecciones virales. La MS proporciona aplicaciones de alto rendimiento, como perfiles lipidómicos, proteómicos y metabolómicos en la COVID-19. Las aplicaciones de la MS brindan además información valiosa sobre los procesos biológicos subyacentes responsables de la gravedad de la enfermedad, lo que puede ser útil para diseñar diagnósticos efectivos para la COVID-19.

Con el desarrollo de espectrómetros de masa portátiles, y la puesta a punto de métodos de muestreos rápidos y apropiados, la detección de SARS-CoV-2 puede ser objeto de mayor atención en el futuro. A pesar de los logros en el desarrollo y adopción de una serie de prácticas de proteómica clínica basadas en la MS, queda pendiente aún el reto de la transferencia paulatina de la mesa de laboratorio a pie de cama, para brindar servicios de puntos de atención y tratamiento personalizado a los pacientes en un futuro próximo. Por lo tanto, la MS se considera una alternativa a la RT-PCR y una plataforma de próxima generación para la supervisión de enfermedades. A medida que estos instrumentos y tecnologías se vuelven más automatizados, accesibles y asequibles y se disponga de ciertas plataformas de MS bien arraigadas en los laboratorios clínicos o de investigación, la proteómica clínica tendrá mayor protagonismo en la mejora del diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento y la monitorización de las enfermedades y la predicción del resultado terapéutico (Birhanu 2023; Do *et al.* 2022; Lazari *et al.* 2023; Lima *et al.* 2022; Zhao *et al.* 2023b).

5. IMPORTANCIA DE LA NANOTECNOLOGÍA

Los nanomateriales tienen características físicas, químicas, biológicas, mecánicas y eléctricas a nanoescala (Asuero 2023), que no se pueden encontrar en el dominio de escala micro y macro. Esto se debe a su gran superficie, tamaño muy pequeño, gran estabilidad y química versátil de la superficie del material al ser modificada su funcionalidad. Los nanomateriales han revolucionado la nanomedicina clínica y juegan un papel vital en la lucha contra las infecciones virales (Goharshadi *et al.* 2022). Se ha demostrado que las nanopartículas son valiosas en la inmovilización de moléculas (Bi *et al.* 2024) al tiempo que preservan su actividad biológica, mejorando la precisión en el ámbito de la detección. Variados materiales biocompatibles (Das y Kundu 2023) muestran un potencial uso como nanomedicinas destinadas a tratamientos antivirales. La contribución de la nanotecnología a la química analítica de la COVID-19 (detección directa o indirecta del SARS-CoV-2) tiene un futuro prometedor (Adhikari *et al.* 2023; Adrah *et al.* 2023; Choi y Yoon 2023; Chaudhary *et al.* 2023; El-Derany *et al.* 2023; Goharshadi *et al.* 2022; Luo *et al.* 2023; Meskher *et al.* 2023; Motiel *et al.* 2023; Perveen *et al.* 2023; Singh y Sodhi 2023; Solanki *et al.* 2023; Soto *et al.* 2023). También juega un papel útil en la mejora del equipo de protección personal, ya que muchas nanopartículas exhiben poderosas propiedades antivirales (de Luca *et al.* 2023; Fu *et al.* 2023; Ghosal 2023; Ivanoska-Dacikj *et al.* 2023; Karim *et al.* 2020; Meda *et al.* 2023).

La implementación de nanotecnologías, como nanomateriales funcionales, técnicas de fabricación de nanoplataformas y nanoingeniería de superficies, ha mejorado el rendimiento de los biosensores (Choi y Yoon 2023;

Yari *et al.* 2023) ampliando al mismo tiempo la gama de objetivos de detección, fundamental en el abordaje emergencias sanitarias como la reciente pandemia de la COVID-19. Conviene destacar los esfuerzos recientes en el diseño de interfases de biodetección y análisis, aportando los nanomateriales una mayor sensibilidad y permitiendo al mismo tiempo (Peng *et al.* 2023; Perveen *et al.* 2023; Ramalingam *et al.* 2023) llevar a cabo el diagnóstico *in situ*. La elevada relación superficie-volumen y sus efectos de tamaño cuántico garantizan una mejora en el rendimiento de los biosensores y sus características rápidas, sensibles, confiables y fáciles de usar son adecuadas para la detección del SARS-CoV-2. Al combinar la biosonda específica (p. ej., proteína S, ACE2, anticuerpo y secuencia de ARN viral) con un sensor físico y químico sensible (Liu *et al.* 2023d), las biomoléculas diana pueden detectarse de manera específica.

Se han puesto de manifiesto las ventajas de aplicar biosensores electroquímicos a diferentes niveles moleculares en la infección por SARS-CoV-2 como elemento de diagnóstico de la COVID-19 en la medicina de precisión (Orozco 2023). Se han ideado mascarillas recubiertas de marcos orgánicos metálicos (Das *et al.* 2023a) para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en tiempo real, que detectan el virus por el cambio de color visual. Los sensores basados en nanomateriales (nanosensores) se han mostrado muy prometedores para la detección de virus en el medio ambiente (Wang *et al.* 2023g) debido a su pequeño tamaño, bajo costo, alta sensibilidad y rápido tiempo de respuesta. Los nanocuerpos (fragmentos monoméricos de unión a antígeno derivados de anticuerpos de camélidos) constituyen una opción viable (Naidoo y Chuturgon 2023) para luchar contra el SARS-CoV-2 y superar la enfermedad.

La aparición de nanozimas también supone una opción prometedora para combatir el SARS-CoV-2 debido a sus propiedades fisicoquímicas estables y elevada área superficial, que permiten interacciones nano-bio múltiples y más fáciles *in vivo*. Las nanozimas estimulan la construcción de nanosensores sensibles y económicos para una detección rápida (Wang *et al.* 2023b), facilitan el desarrollo de medicamentos específicos con efectos secundarios mínimos para terapias dirigidas, desencadenan mecanismos defensivos en forma de vacunas y eliminan el SARS-CoV-2 del medio ambiente para su prevención.

Los nanoportadores constituyen un elemento clave ya sea en la encapsulación y presentación de antígenos (Lozano *et al.* 2023; Hinger *et al.* 2023; Prabhakar *et al.* 2023; Ren *et al.* 2023; Wibowo *et al.* 2023; Ye *et al.* 2023; Zhou *et al.* 2023a) como en la estimulación del sistema inmunológico a través de la co-entrega de antígeno y adyuvante. Las vacunas pioneras de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) contra la COVID-19 de Pfizer-BioNTech y Moderna utilizan nanopartículas en su administración. Las ocho líneas maestras asociadas con el desarrollo de vacunas para producir inmunidad frente al SARS-CoV-2 se muestran en la figura 5. En la figura se muestra también el Profesor Mariano Esteban, investigador responsable de una de las vacunas españolas puestas a punto, basada en el virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) (Villadiego *et al.* 2023).

La OMS informó que, al 2 de diciembre de 2022, 376 tipos de vacunas contra el SARS-CoV-2 se encontraban en investigación y 199 en etapa preclínica. En los 17 ensayos clínicos, 6 eran vacunas de proteínas recombinantes, 41 vacunas de ARN, 16 vacunas de ADN y 23 vacunas de vectores virales, 22 vacunas inactivadas, 2 vacunas vivas atenuadas, etc...El tema de las vacunas se trata con gran profundidad en el capítulo XXVI. El esfuerzo concertado a nivel mundial ha allanado el camino hacia las vacunas, en un tiempo récord. La «Food and Drug Administration» (FDA) autorizó, para uso de emergencia, las dos vacunas mencionadas, así como la vacuna COVID-19 de vector viral de dosis única Janssen de Johnson & Johnson. Además de estas tres, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) también aprobó el uso de la vacuna de vector viral AstraZeneca y más recientemente en diciembre de 2021 el de una quinta de subunidades proteica, la Novavax y posteriormente las de Valneva, Sanofi Pasteur e Hipra.

La eficacia de las vacunas ha proporcionado un control suficiente sobre la enfermedad revirtiendo la vida social a la normalidad, poco a poco, a nivel mundial. Aunque estas vacunas no llegaron (Cueni 2022) a los países de ingresos más bajos con la suficiente rapidez; la ciencia cumplió, pero el desafío de la equidad no. Katalin Karikó (1965-), húngara, de BioNTechRNA Pharmaceuticals y Drew Weissman (1959-), inmunólogo de la Universidad de Pensilvania, han recibido (Robinson 2023) el Premio Nobel de Medicina o Fisiología 2023 «por sus descubrimientos sobre modificaciones de bases de nucleósidos que permitieron el desarrollo de vacunas de ARNm eficaces contra la COVID-19»; https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2023/press-release/

6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DIGITAL (DPCR)

La PCR es un método enzimático de amplificación génica en el que múltiples copias de segmentos específicos de ADN se generan para su clonación, secuenciación y análisis (Asuero 2022; Martin *et al.* 2021). Esta tecnología permite un diagnóstico oportuno y preciso de SARS-CoV-2 con RT-PCR en muestras del tracto respiratorio. Desde que se descubrió la polimerasa resistente a

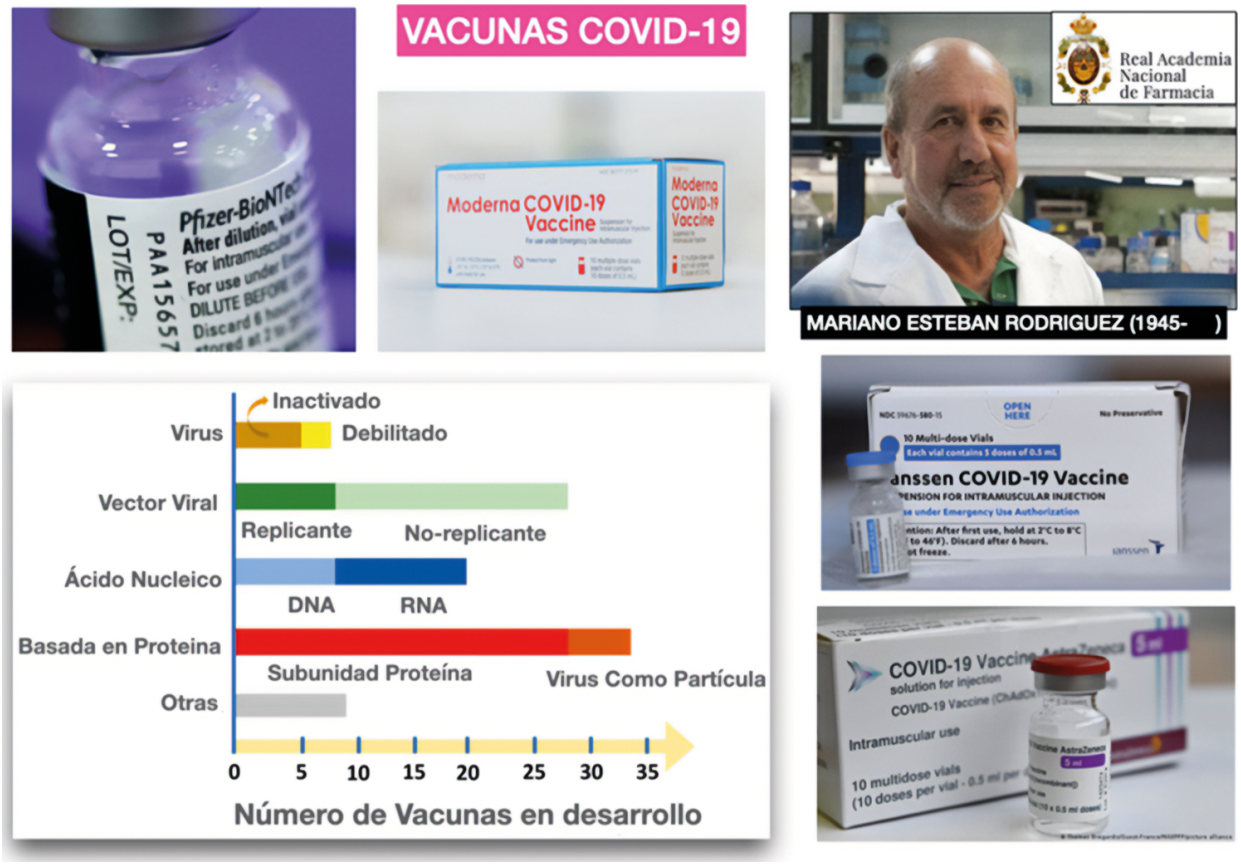


Figura 5. Vacunas Pfizer, Moderna, Janssen y Astra Zeneca, y Hoja de ruta del desarrollo de vacunas contra el SARS-CoV-2: vacunas propuestas según la OMS (Kaushik *et al.* 2020). Fuente: American Chemical Society (ACS)

altas temperaturas (Taqase) y se aplicó la PCR en 1986 (Cave 2022), por Kary Banks Mullis (1944-2006), Premio Nobel de Química en 1993, la PCR ha progresado (Xu *et al.* 2023) desde la primera generación de PCR simple hasta otra segunda de PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real (qPCR) y una tercera generación de PCR digital (dPCR), acompañada de la mejora de la capacidad de detección del análisis cualitativo al cuantitativo y al cuantitativo absoluto (Xu *et al.* 2023). La PCR digital es un método simple y reproducible que no depende de una curva de calibrado para la cuantificación de la secuencia de ADN diana (Yao *et al.* 2022), ni de genes de referencia y es más resistente a factores tales como inhibidores de amplificación de plantilla que pueden producir falsos negativos (Salgado Fernández *et al.* 2022).

El concepto de dPCR para medición absoluta fue introducido (Dhawan y Dangla 2019; Morley 2014; Yao *et al.* 2022) por primera vez en 1992 por Pamela J. Skyes, australiana, que utilizó esta técnica de medición para la detección de genes con cadenas pesadas mutadas mediante dilución limitante y cuantificación de señales de punto final. El trabajo fundamental fue publicado en 1999 por Berl Vogelstein (1949-), Premio Príncipe de Asturias de Investigación Científica y Técnica 2004, y Kenneth W. Kinzler (1962-), actuales profesores de la Universidad Johns Hopkins, desarrollando un método en el que se diluían muestras y se amplificaban y detectaban particiones y señales mediante fluorescencia (Nazir 2023), acuñando el término «PCR digital» que todos conocemos hoy día.

Las tecnologías de microfluidos de gotas se han utilizado ampliamente como estrategia de compartimentación de dPCR debido (Choi *et al.* 2023) a su automatización, alto rendimiento y propiedades de monodispersión. La dPCR se puede utilizar para cuantificar una carga viral baja, monitorear el virus en el medio ambiente, evaluar medicamentos anti-SARS-CoV-2 y detectar variantes genéticas (Salgado Fernández *et al.* 2022). Hay algunas oportunidades de mejora en el desarrollo (Kumar *et al.* 2023b; Nazir *et al.* 2023; Yao 2022) de nuevas plataformas de RT-PCR, que cubren una mejor tolerancia de los efectos de la matriz y la compatibilidad con muestras más simples o mínimas, p. ej. dPCR o ddPCR (PCR digital en gotas). Los cebadores, las sondas y los reactivos son los mismos, pero la solución de reacción a granel (Choi *et al.* 2023; Xu *et al.* 2023) se divide en una miríada de microgotas nanolitizadas. La partición reduce eficazmente la competencia de las plantillas por

los cebadores. En adición, el volumen de nanolitros de los reactores de gotitas aisladas aumenta drásticamente la concentración efectiva local de la diana, lo que favorece la cinética y la eficacia de la reacción, reduciéndose el límite de detección consiguiente.

La PCR digital y su utilización en COVID-19 ha demostrado cómo la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos ofrece (Kumar *et al.* 2023b) oportunidades prometedoras en la investigación clínica en comparación con otros estudios basados en biomarcadores. Comparado con RT-PCR tradicional, las principales ventajas de dPCR se reflejan en una elevada precisión y sensibilidad, estabilidad del sistema, excelente repetitividad, y un menor número de falsos negativos y falsos positivos, en particular sobre trazas de muestras. Según el tipo de separación de líquidos, la dPCR se puede dividir en PCR digital microfluídica (mdPCR), PCR digital de gotas (ddPCR) y PCR digital en chip (cdPCR). La ddPCR basada en microfluidos tiene ventajas significativas sobre las dos generaciones anteriores de PCR en términos de alta sensibilidad y bajo consumo de muestra. Además, la ddPCR no se basa en la curva estándar para lograr una cuantificación absoluta, lo que se considera un gran avance, y tiene sus propias ventajas en la detección de patógenos, y en el diagnóstico de enfermedades.

No obstante, sus deficiencias también son obvias, como operación compleja, alto nivel técnico requerido, costo, y dificultad para popularizarse y aplicarse en áreas epidémicas y centros de atención primaria. La dPCR tiene mayor precisión y no depende de referencias ni estándares, pero el instrumento, el reactivo y los chips son muy caros. La PCR digital basada en gotas (ddPCR) adolece de la fusión de gotas (Choi *et al.* 2023) que puede generarse durante las etapas del ciclo térmico.

7. LAB-ON-A-CHIP (LOC)

Los dispositivos de microfluidos son muy adecuados para la detección rápida y económica de infecciones virales y, por lo tanto, se han aplicado con profusión (Lin *et al.* 2023b; Tarim *et al.* 2023) en la detección del SARS-CoV-2. Desempeñan un papel fundamental en las plataformas de detección de la COVID-19 existentes. Los dispositivos Lab-on-a-chip (LOC) son «microdispositivos que combinan la tecnología de microfluidos con funciones eléctricas y/o mecánicas para analizar volúmenes de fluidos muy pequeños» (Burdino *et al.* 2022; Mushin *et al.* 2023; Xu *et al.* 2023). La detección microfluídica de SARS-CoV-2 ha experimentado un progreso significativo con mejoras en los límites de detección y tiempos de análisis, con alta sensibilidad y especificidad. Se obtienen resultados precisos con escasos volúmenes de reactivos y de muestras (Kumar *et al.* 2022a), lo que la hace adecuada para POC. El empleo combinado de LOC/POC brinda mejores soluciones de atención médica, en términos de coste-beneficio, sin tener que recurrir a la formación de profesionales y a la necesidad de disponer de herramientas complejas para interpretar los resultados. El desarrollo de sistemas con estas características que permitan la detección del SARS-CoV-2 en fluidos biológicos a concentraciones (Lin *et al.* 2023b; Nafian *et al.* 2023; Tarim *et al.* 2023) del orden de femtomolar (fM), picomolar (pM) o nanomolar (nM) constituiría sin duda un gran logro.

La saliva, puede emplearse para detectar y monitorizar diferentes biomarcadores. Es una matriz más compleja que el hisopo nasofaríngeo, y tratada adecuadamente si es necesario, es la muestra más utilizada para el diagnóstico (Lin *et al.* 2023b; Mohammadi *et al.* 2021) en la mayoría de los estudios microfluídicos. La toma de muestra de la saliva es más confortable (que la recolección de sangre o lágrimas) para el paciente (Li *et al.* 2024b), y no requiere ninguna acción adicional para prevenir la coagulación, como es el caso de la sangre, siendo menor el riesgo de contaminación del personal. La saliva puede contener mayores concentraciones de virus en los primeros estadios de la infección, convirtiéndose en un excelente medio de investigación por lo que está siendo objeto de una atención creciente.

Los métodos de fabricación novedosos, como la impresión 3D y los métodos innovadores de manipulación y análisis de muestras (Asuero 2022), la informática médica, la inteligencia artificial (IA), la Internet de las cosas (IoT), los sistemas de soporte a la decisión, el aprendizaje automático y el procesamiento de datos integrados con la microfluídica, constituyen en última instancia (Tarim *et al.* 2023) un decidido apoyo a la eficiencia y eficacia de las herramientas de diagnóstico, a las estrategias de tratamiento y al desarrollo de vacunas, convirtiendo a las técnicas LOC en una opción atractiva para científicos y empresas. La combinación de varias técnicas en chips de microfluidos ha supuesto el desarrollo de numerosas plataformas integradas (Asuero 2022).

Se ha ensayado como prueba de concepto para la detección de la COVID-19 una plataforma en chip basada en LAMP que combina el uso (Das *et al.* 2024) de difusometría rotacional y partículas Janus dotadas de funcionalidad empleando un plásmido recombinante que contiene una secuencia de ADNc del gen de la proteína no estructural 2 (nsp2) del SARS-CoV-2. Los cebadores diseñados y las partículas de Janus indicadas se cargan simultáneamente en un chip de microfluidos, compuesto por tres capas de polimetilmetacrilato (PMMA) para realizar la reacción LAMP en una placa caliente.

8. IMPORTANCIA DE LAS TÉCNICAS EMERGENTES

Estas técnicas emergentes (Castellanos y Somoza 2023; Karki *et al.* 2024; Karuppaiah *et al.* 2023; Kumar *et al.* 2023c; Mishra *et al.* 2023; Motiel *et al.* 2023; Rehman *et al.* 2023; Solanski *et al.* 2023; Zafar *et al.* 2022) son de vital importancia para la detección, monitorización, diagnóstico, detección y vigilancia de la COVID-19. Podemos citar:

1. Detección basada en aptámeros de moléculas receptoras bioinspiradas de oligonucleótidos de ácidos nucleicos monocatenarios (Aslan *et al.* 2023; Yang *et al.* 2023b; Zhang y Li 2023).
2. Detección basada en tecnología de impresión molecular (Chatterjee *et al.* 2023; He *et al.* 2024; Li *et al.* 2024c).
3. Herramientas de micromatrices multifuncionales de alto rendimiento en paralelo de proteínas (Acharjee *et al.* 2023; Krishanthi *et al.* 2023).
4. Pruebas de aglutinación (Kobayashi *et al.* 2023).
5. Dispositivos basados en papel de alta sensibilidad y especificidad, detección de múltiples dianas de ADN (Kim y Lee 2022; Liu *et al.* 2023c).
6. Reconocimiento LFIA multiplexado de objetivos simultáneos (Boukli *et al.* 2023; Clark *et al.* 2023; Liu *et al.* 2023b; Sena-Torralba *et al.* 2022).
7. Nuevos enfoques de biomarcadores (Faham *et al.* 2023; Sundeep *et al.* 2023; Vásquez y Orozco 2023), *e. g.* análisis de aliento (Blochouse *et al.* 2023; Roquencourt *et al.* 2023).
8. Entornos de descentralización, p. ej. sensores portátiles (Chug *et al.* 2023; Ghorbanizamani *et al.* 2023; Kalasin y Surareungchai 2023; Park *et al.* 2023).
9. Pruebas de muestras basadas en robots y otras aplicaciones robóticas para la detección, el cribado y el diagnóstico (Sikander *et al.* 2023; Tuisku *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023f).

Algunas de estas cuestiones deben ser objeto de mayor investigación y atención, pero hasta ahora solo gozan de un futuro prometedor de cara a pasar de la escala de laboratorio a la situación real de comercialización.

9. APTÁMEROS

Los aptámeros son pequeños ácidos oligonucleótidos (20-100) monocatenarios o moléculas de péptidos sintéticas que se unen a su diana con una alta especificidad (Chang *et al.* 2023; Futane *et al.* 2023; Saygili *et al.* 2023; Yang *et al.* 2023b; Yang *et al.* 2023c). El nombre deriva de las palabras latinas «aptus», que significa «ajuste» o «aptare» (ajustar) y la palabra griega «meros», que significa parte. Se utilizan en la detección rápida de virus convirtiéndose en una alternativa a los anticuerpos en el escenario biotecnológico. Las tecnologías innovadoras utilizadas en bioanálisis que implica el uso de aptámeros con microdispositivos se muestran en la figura 6. Las compañías farmacéuticas y la comunidad científica han estado trabajando muy duro en la última década para (Zhang y Li 2023) desvelar todo el potencial que conlleva el uso clínico de los aptámeros. Desde que comenzó la pandemia de la COVID-19, se han creado numerosos aptámeros que han mostrado una especificidad y afinidad notables por dianas virales y tienen el potencial de usarse como herramientas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Los aptámeros son seleccionados a partir de bibliotecas altamente complejas de ácidos nucleicos fabricados por síntesis combinatoria (Sánchez-Báscones *et al.* 2021; Xue *et al.* 2021) mediante enriquecimiento *in vitro*. El proceso, denominado SELEX, se describe por primera vez en 1990 por dos grupos (Ellington 2014; Gold 2015; Gold 2006) independientes: Criag Tuerk y Larry Gold, de la Universidad de Colorado y Andrew Ellington, actualmente en la Universidad de Texas en Austin y Jack William Szostak (1952-), de la Universidad de Hardvard, Premio Nobel de Medicina en 2009, quienes acuñan el nombre de aptámero (al parecer sugerido por Nina Tovisht, una estudiante de Literatura de la Universidad de Yale). Los aptámeros pueden acoplarse (Aloraij *et al.* 2023; Wandt *et al.* 2022; Zhang y Li 2023) al dominio de unión al receptor (RBD) del SARS-CoV-2 con alta afinidad empleando una estrategia de selección basada en la competición con la ACE2. Esta capacidad inhibitoria de la infección por SARS-CoV-2 alberga potencial terapéutico (Amini *et al.* 2022; Zhang y Li 2023; Yu *et al.* 2023b). La unión de los aptámeros está controlada por sus estructuras terciarias (Zhang y Li 2023), que pueden plegarse en muchas estructuras únicas, como tallo-bucle/horquilla, pseudonudo, beso-bucle, unión de tres vías, protuberancia interna y G-cuádruple. Los aptámeros pueden considerarse como «anticuerpos sintéticos» con actividad enlazante comparable o mejor que la de los anticuerpos y con menores o ningunos efectos inmunogénicos (Saygili *et al.* 2023).

Se ha ideado un aptasensor de resonancia de plasmón de superficie (SPR) no etiquetado (Erdem *et al.* 2022) que detecta el gen N del SARS-CoV-2. Los aptámeros se crean mediante un procedimiento de selección *in vitro* sin animales; por tanto, no existe ningún requisito de vacunación animal. Se ha captado la interacción entre un aptámero de ADN monocatenario (ss) de 60 bases y la proteína S viral utilizando herramientas (Khan *et al.* 2024) bioinformáticas y de acoplamiento molecular. El aptámero se inmoviliza en la superficie de un electrodo modificado con nanopartículas de oro (AuNP)

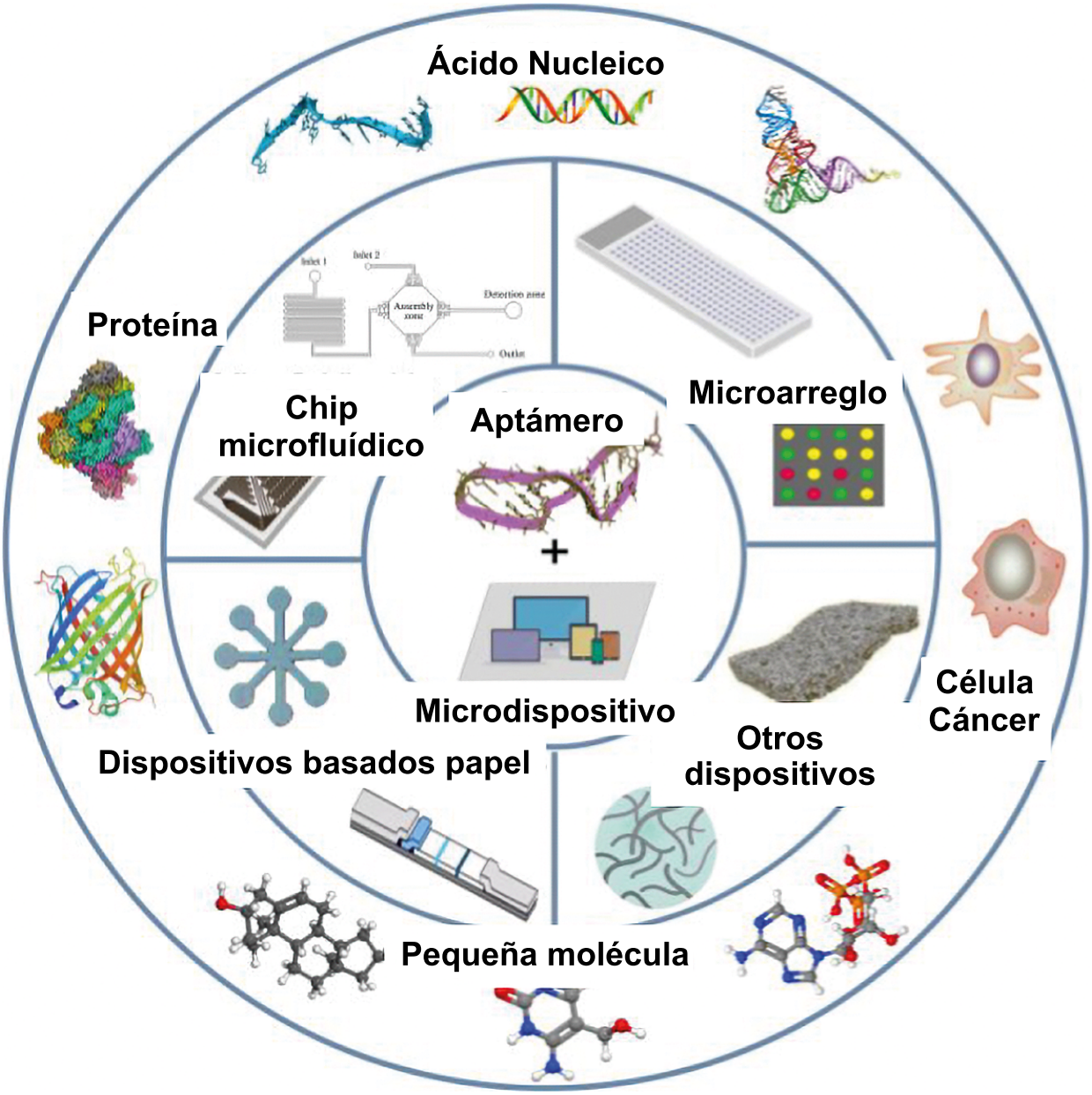


Figura 6. Ilustración esquemática de los microdispositivos aptámeros funcionalizados para bioanálisis (Xue *et al.* 2021).
Fuente: American Chemical Society (ACS)

utilizándose azul de metileno (MB, Methylene Blue) como indicador redox. En presencia de la proteína S, la diana induce cambios conformacionales en la estructura del aptámero, generando un aumento en la señal redox del MB, con un rango lineal entre 10 pM a 6 nM y un límite de detección de 91,1 pM usando voltamperometría de pulso diferencial (DPV), investigándose su uso en muestras de suero y saliva humana enriquecidas.

Entre las ventajas (Aloraij *et al.* 2023; Saygili *et al.* 2023) de los aptámeros frente a los anticuerpos destacan: i) pequeño tamaño y estructura flexible, lo que facilita la penetración en los tejidos y entrada a las células y sus compartimentos; ii) procesos simples, rápidos y reproducibles de síntesis química, que conducen a formulaciones de alta pureza, con mínima variación entre lotes; iii) almacenaje a temperatura ambiente sin degradación y mejora de sus propiedades (activación de la superficie) mediante modificaciones químicas versátiles; iv) no inducen respuestas inmunitarias y carecen de toxicidad. La fabricación y distribución a gran escala de aptámeros no supone un problema complejo, dado que muchos laboratorios industriales tienen experiencia previa en la producción masiva de oligonucleótidos con fines de diagnóstico. De ahí que pueda no ser necesario destinar a la producción considerables recursos para la adquisición de equipos especializados y la capacitación del personal.

Aunque SELEX es una tecnología bien establecida, comporta algunos problemas, *e. g.* la obtención de posibles candidatos puede conllevar semanas, incluso meses. Se han desarrollado estrategias novedosas y efectivas para identificar aptámeros frente a dianas específicas, como la aplicación de enfoques computacionales para la identificación, lo que aumenta la eficiencia de la selección. La identificación con inteligencia artificial (IA) es una de las tecnologías emergentes más recientes para la predicción de la unión entre aptámeros y dianas. En el desarrollo de fármacos, la IA, en particular los algoritmos de aprendizaje profundo/maquina (Saygili *et al.* 2023), permite de entre millones de secuencias diferentes, seleccionar e identificar rápidamente aptámeros con alta afinidad y especificidad por las moléculas dianas, en función de las características de los aptámeros que se predijeron a partir del análisis de la estructura del aptámero-objetivo.

A pesar del tremendo éxito obtenido en el desarrollo de aptámeros (Amini *et al.* 2022) con posibles aplicaciones de diagnóstico para el SARS-CoV-2, fáciles de implementar en diferentes plataformas de detección, incluidos microarrays, biosensores y pruebas de flujo lateral, su uso en entornos clínicos ha sido extremadamente lento, a tenor del pequeño número de ensayos clínicos realizados. La principal dificultad radica en como elegir los mejores candidatos para las pruebas, dado el elevado número de propuestas a considerar. Una prueba de aptámero de ADN de COVID-19 basada en saliva se ha convertido (Liu *et al.* 2023e), en concreto, en un producto disponible comercialmente. La mayoría de los aptámeros de COVID carecen de información suficiente sobre su mecanismo de interacción y su eficiencia y seguridad en modelos celulares o animales. La ausencia de estándares en las pruebas clínicas y preclínicas de aptámeros plantea serios obstáculos para su uso generalizado. La creación de protocolos estandarizados para la selección, el uso y las pruebas de aptámeros es una forma de superar este reto. Entre las restricciones al uso de aptámeros como herramientas terapéuticas se incluye la reactividad cruzada, disponibilidad limitada, rápida rotura por nucleasas en fluidos biológicos y tejidos y eliminación vía filtración renal (Saygili *et al.* 2023).

10. POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR

El concepto de polímero molecular impreso data de 1931 cuando el ruso M.V. Polyakov demostró las propiedades de adsorción específica del gel de sílice (Alexander *et al.* 2006; Diaz Álvarez *et al.* 2023; Yarman y Kurbanoglu 2022) reconocida por su diana Naranja de Metilo. No obstante, la síntesis de estos compuestos (Wulff 2013) fue impulsada por Günter Wulff (1935-), alemán, de la Universidad Heinrich-Heise de Düsseldorf, en 1972 y Klaus Mosbach (1932-), bioquímico sueco, actual Profesor Emérito de la Universidad de Lund, en 1981. En las últimas décadas se ha prestado una atención creciente a la sustitución de reactivos biológicos en bioanálisis, técnicas de separación y materiales biomiméticos tales como polímeros orgánicos sintéticos (polímeros moleculares impresos) y aptámeros. La IUPAC define el término biomimético como «referente a un procedimiento de laboratorio diseñado para imitar un proceso químico natural, a un compuesto diseñado para imitar un proceso químico natural, o a un compuesto que imita un material biológico en estructura o función». Una motivación importante para el desarrollo y la aplicación de elementos de reconocimiento biomiméticos es su potencial estabilidad y bajo precio en comparación con el de las biomoléculas.

Los polímeros de impresión molecular (MIP), conocidos como «receptores artificiales», muestran propiedades similares a las de los receptores naturales como material biomimético (Li *et al.* 2024c). La síntesis de polímeros de impronta molecular (MIP) implica la polimerización de monómeros funcionales y entrecruzados en torno a una plantilla elegida, que luego se extrae, lo que origina una red polimérica porosa, caracterizada por la presencia de cavidades de unión que se ajustan (Yarman y Kurbanoglu 2022) al tamaño, la forma y las funcionalidades de la diana perseguida. El polímero de impronta molecular (MIP), utiliza tecnología de impronta molecular (MIT), con polímeros, hidrogeles o materiales autoensamblados, y puede emplearse como herramienta de diagnóstico al unirse (Chatterjee *et al.* 2023; Díaz-Álvarez *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023d) a una estructura predecible con alta afinidad y especificidad, análoga al modelo de «cerradura y llave» de reconocimiento enzima-sustrato, mejorando los sitios de unión complementaria en términos de tamaño y forma. Como los sitios de unión de los MIP imitan a los anticuerpos, también se los denomina anticuerpos artificiales o hechos a medida.

Los cinco actores principales en el mercado de aptasensores son «The Reagents of the University of California» (US), «Searete Llc», Delaware (US), «Massachusetts Institute of Technology» (US), «President and Fellows of Harvard College» (US) y «Roche Diagnostics Operations, Inc» (Futane *et al.* 2023).

La selectividad del reconocimiento de dianas objetivos se mejora notablemente cuando (He *et al.* 2024) se introducen MIP en sensores. Los MIPs se acoplan a una variedad de transductores con objeto de favorecer el reconocimiento de los analitos, entre los que dominan claramente los sistemas electroquímicos y ópticos. Se han descrito en la bibliografía variados sensores frente al SARS-CoV-2 basados en MIPs e incluso la compañía «MIP Diagnostics (Colworth Park, Sharnbrook Bedford, UK)» produce nanoMIPs comerciales (Yarman

y Kurbanoglu 2024). El empleo de MIPs como sensores sirve como una plataforma sustitutiva para la detección selectiva del dominio receptor (RBD) de la proteína spike S del SARS-CoV-2 (Singhal *et al.* 2022; Wang *et al.* 2023d), incluso en la presencia del RBD de coronavirus similares, debido a sus características exclusivas predeterminadas de robustez intrínseca, selectividad y reproducibilidad. Se ha propuesto un kit de detección rápida en el punto de atención basado en MIP que utiliza una combinación de un sensor basado en MIP y un aptámero específico del SARS-CoV-2 con alta especificidad. También se han ideado sensores electroquímicos para la detección de la nucleoproteína N del SARs-CoV-2 (He *et al.* 2024) en hisopos nasofaríngeos (Chatterjee *et al.* 2023).

Se han generado micromatrices MIP en chips de imágenes por resonancia de plasmón de superficie de oro (SPRi) que permiten el reconocimiento selectivo (Bognár *et al.* 2022) del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína pico (S) del virus SARS-CoV-2 utilizando para la impresión del epítopo una secuencia nonapeptídica característica, GFNCYFPLQ, del RBD. Este concepto puede adaptarse para reconocer diferentes mutantes de virus y discriminar entre proteínas estrechamente homólogas. Un polímero híbrido de aptámero-impresión molecular (aptaMIP) mantiene el reconocimiento selectivo de la plantilla de proteína de pico S del SARS-CoV-2 a través de varias mutaciones (Sullivan *et al.* 2023), al tiempo que mejora el rendimiento sobre aptámeros individuales o componentes MIP (que por sí mismos demuestran un rendimiento excelente).

El enfoque MIP posee ventajas debido a su bajo costo, facilidad de síntesis y estabilidad a largo plazo, suficientes para promover la proliferación de estrategias, ya que resulta necesario el desarrollo de receptores de virus artificiales eficientes, rentables y reutilizables. No obstante, todavía existen problemas importantes al utilizar los MIP, *e. g.*, selección de monómeros, métodos de lavado y eliminación, baja capacidad de enlace, interferencias indeseables y escasa eficacia y reproducibilidad. Los teléfonos inteligentes, con sus sensores integrados y potentes capacidades de imágenes digitales, proporcionan una plataforma única para las necesidades de portabilidad y detección instantánea. Se espera que los sensores MIP basados en teléfonos inteligentes se conviertan en una nueva vía de investigación en el futuro (He *et al.* 2024).

11. MICROARRAYS

La utilización de la tecnología de microarrays de ADN proporciona un medio útil (Krishanthi *et al.* 2023) para medir los niveles de expresión génica simultáneamente, lo que la convierte en una herramienta valiosa para diversas aplicaciones, tales como polimorfismo de nucleótido único (SNP) y detección de mutaciones, clasificación de tumores, identificación de genes diana y biomarcadores, identificación de genes de quimiorresistencia, y descubrimiento de fármacos. El ensayo de microarrays es un método de microfluidos (Beck *et al.* 2022; Sucre *et al.* 2022) que permite detectar rápidamente el ARN del virus. Tras la transcripción inversa, el ARN viral produce ADN complementario (ADNc) marcados con una sonda específica para cargar en cada pocillo, seguido de la hibridación entre los oligonucleótidos fijados en la micromatriz. A continuación, se eliminan los ADN libres y se detecta el virus a través de sondas específicas. El ensayo de microarrays es una poderosa herramienta analítica, que puede detectar simultáneamente múltiples dianas (cientos o incluso miles) en un pequeño volumen de muestra.

Las plataformas basadas en microarrays pueden clasificarse sobre la base del tipo de matriz (sólida o líquida), el tamaño y la densidad de la sonda, el método utilizado para visualizar la hibridación de los resultados y los costos relativos. El examen completo de las respuestas de anticuerpos humorales en pacientes afectados por la COVID-19 con el uso de microarrays de proteínas es una herramienta valiosa (Acharjee *et al.* 2023; Krishanthi *et al.* 2023) para comprender la inmunidad, identificar objetivos de diagnóstico y desarrollar terapias COVID-19. Un método híbrido que utiliza el algoritmo binario de «reptile search» permite (Krishanthi *et al.* 2023) identificar el subconjunto óptimo de genes asociados con la COVID-19 a partir de datos de secuenciación de ARN. El algoritmo de búsqueda de reptiles (RSA), introducido es un novedoso optimizador metaheurístico inspirado en la naturaleza y motivado por las pautas de conducta (Sasmal *et al.* 2023) de caza del cocodrilo. Fue introducido por Abualigah *et al.* (2022).

Los microarrays de péptidos se han convertido en la punta de lanza de la investigación básica y clínica, ya que pueden identificar nuevos epítopos con una resolución del orden de aminoácidos. Una caracterización exhaustiva de las respuestas de los anticuerpos humorales a las proteínas virales (Acharjee *et al.* 2023) requiere herramientas que puedan desentrañar los epítopos disponibles en todo el proteoma del SARS-CoV-2.

12. ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN

La aglutinación hace referencia al ensamblaje de dos componentes multivalentes en grandes agregados mediante interacciones de uniones específicas (Srivastava *et al.* 2021; Wang *et al.* 2023e) en relaciones de concentraciones apropiadas. La aglutinación solo requiere mezclar los dos componentes y es eficaz para generar grandes agregados visibles en poco tiempo. La mayoría de las

pruebas de aglutinación utilizan la diana como uno de los agentes de aglutinación y la señal proviene de la aglutinación misma. La aglutinación de glóbulos rojos se usa ampliamente en la tipificación sanguínea, mientras que los ensayos de aglutinación de partículas de látex se han usado para detectar anticuerpos contra una variedad de virus diferentes.

Un anticuerpo biotinilado (Ab) y la estreptavidina (SA) se aglutinan en grandes agregados debido a múltiples biotinas por Ab y múltiples sitios de unión de biotina por SA. Las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DSL, dispersion and scattering of light) mostraron que el agregado aglutinado podía alcanzar un diámetro de más de 0,5 μm y de más de 1,5 μm usando poli-SA. El ensayo de aglutinación se dirige (Wang *et al.* 2023d) al antígeno de la nucleocápside del SARS-CoV-2 en el diagnóstico de la COVID-19 a partir de la saliva.

La aglutinación de glóbulos rojos o partículas de látex inducida por interacciones específicas antígeno-anticuerpo proporciona (Kobayashi *et al.* 2023) un ensayo altamente sensible y preciso para anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Este sencillo ensayo no requiere ningún instrumento (Esmail *et al.* 2021) y genera resultados en 2 minutos, y puede potencialmente ser utilizado como una prueba POC. El ensayo final pudo detectar hasta 10 pg mL^{-1} del antígeno de la nucleocápside del SARS-CoV-2 y 250 copias del genoma por μL de virus inactivado añadido a la saliva.

13. DISPOSITIVOS BASADOS EN PAPEL

Los dispositivos analíticos basados en papel muestran un gran potencial para dotar de sistemas de diagnóstico POC a los países en vías de desarrollo, dadas sus notables propiedades (Kim y Lee 2022) como biocompatibilidad, porosidad, facilidad de modificación, flexibilidad, inercia química, respeto al medio ambiente y facilidad de almacenamiento y transporte. La tecnología que mejor puede satisfacer (Pinheiro *et al.* 2021) la fuerte demanda de pruebas de diagnóstico POC prácticas en el control de la COVID-19 son las pruebas POC en papel. Las expectativas de las plataformas de detección de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) basadas en papel son obvias debido a la facilidad de fabricación, economía de escala y sencillez de cada uno de los componentes. Su uso comporta tres etapas secuenciales (Sritong *et al.* 2023): recolección y preparación de muestras, amplificación de ADN o ARN de patógenos de interés y detección. Esto, dentro de un ecosistema más amplio de flujo de trabajo, facilidades de uso y capacidad de fabricación y de recolección e interpretación de muestras, que puede verse enormemente perturbado durante el surgimiento de una pandemia.

El papel posee muchas ventajas en la detección de virus (Asuero 2022; Kim y Lee 2022; Ozer y Henry 2021; Sritong *et al.* 2023) entre las que se incluyen su capacidad de almacenar moléculas bioactivas durante largos períodos de tiempo, flujo libre de bombas y bajo costo. Los biosensores basados en papel (PBB) se han investigado con profusión para desarrollar dispositivos POC, gracias a su sencillez, asequibilidad y facilidad de uso (Asuero 2022; Ko y Liao 2023; Liu *et al.* 2023c). La utilización de nanopartículas (NP) como etiquetas juega un papel crucial en el diseño y desarrollo de una tira de PBB (Kumar *et al.* 2022a). El rendimiento de estos dispositivos se ve afectado directamente por la elección de las NP y el método de detección correspondiente. Los ensayos basados en papel se pueden clasificar (Antiochia 2021) en tres categorías: los de tira reactivas (dipstick) (plataformas unidimensionales simples), de flujo lateral (LFA) y plataformas tridimensionales complejas, como dispositivos de ensayos de microfluidos en papel (μPAD) y dispositivos de ensayo electroquímico en papel (ePAD). Los dispositivos basados en papel (Rink y Baeumner 2023) son bastante apropiados para el seguimiento de la transmisión de la COVID-19 analizando el SARS-CoV-2 en aguas residuales comunitarias, heces, orina u otra excreción humana.

La detección colorimétrica basada en papel, una poderosa técnica analítica que explota los cambios de color o de absorbancia de una especie química para detectar y cuantificar analitos de interés, resulta cada vez más atractiva. Un sensor capacitivo libre de anticuerpos, desechable, altamente sensible, posibilita el diagnóstico rápido de la COVID-19. La limonina extraída de semillas de pomelo cítrico mediante síntesis verde se toma como material sensor (Sahu *et al.* 2023) debido a que su cadena interactúa con la proteína S del SARS-CoV-2, en contraste con otros virus que producen neumonías similares. El sensor capacitivo basado en una estructura de electrodo de peine se fabrica en papel Whatman degradable con una capa de limonina y se calibra con muestras de hisopos conocidas de COVID-19 +ve, COVID-19-ve, influenza A e influenza B con respecto a un medio de transporte para virus (VTM).

Una plataforma novedosa para la detección dual del SARS-CoV-2 en papel impreso en cera utiliza nanopartículas de oro (AuNP) para el cribado colorimétrico (Punnoy *et al.* 2023), lográndose una alta sensibilidad de detección mediante espectrometría de masas de desorción/ionización láser (LDI-MS). El sensor colorimétrico se observa fácilmente a simple vista (rango lineal de 25 a 200 μg mL^{-1}). LDI-MS, proporciona una detección sensible de SARS-CoV-2 con un rango lineal de 0,01 a 1 μg mL^{-1} que cubre el valor límite de 0,048 μg mL^{-1} para la indicación de COVID-19 en saliva humana, y así

permite identificar satisfactoriamente a los sujetos afectados por la infección, validándose los resultados mediante RT-PCR. Las perspectivas de futuro de los sensores colorimétricos basados en papel (Ko y Liao 2023) apuntan hacia un aumento de la sensibilidad y especificidad, capacidades multiplexoras, integración de las tecnologías digitales, demandas de manufactura, aplicaciones POC más allá del diagnóstico e integración de datos analíticos con inteligencia artificial (AI).

Se dispone de nuevas plataformas de diagnóstico basadas en papel integradas con tecnologías avanzadas como nanotecnología, aptámeros, espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente inter espaciadas (CRISP)-Cas. En particular, los biosensores imprimibles en papel han ganado una popularidad creciente al proporcionar plataformas asequibles debido a sus ventajas, como la detección rentable, precisa, simple y eficiente de enfermedades en el diagnóstico clínico. Sin embargo, es necesario desarrollar todavía mejores métodos de fabricación e inmovilización para asegurar la estabilidad de la señal y disponer de reactivos adecuados para su regulación, aunque se han producido avances notables en el campo (Liu *et al.* 2023c).

El papel y otros materiales a base de celulosa (Asuero 2022; Pinheiro *et al.* 2021) muestra un interés potencial para su aplicación como una opción viable en múltiples esquemas de biodetección, tratándose de alternativas rentables, accesibles, portátiles y más sostenibles que pueden complementar la identificación y el diagnóstico del SARS-CoV-2, al mismo tiempo que son capaces de ayudar en el manejo de la COVID-19 en pacientes infectados.

14. RECONOCIMIENTO DE DIANAS SIMULTÁNEAS (ENSAYOS MULTIPLEXORES)

La detección múltiple (Lee *et al.* 2023) se hace necesaria en numerosas pruebas de diagnóstico médico, ya que muchas enfermedades infecciosas tienen síntomas muy parecidos, como el SARS-CoV-2 y el resfriado común. Además, algunas enfermedades son causadas por la coexistencia de varios patógenos y serotipos. Los diagnósticos médicos se benefician por tanto de la detección simultánea y rápida de múltiples dianas (Boukli *et al.* 2023; Clark *et al.* 2023; Diel y Nienhaus 2023) en contraste con las de un solo objetivo, al mejorar la eficacia y reducir los costos, en especial cuando la disponibilidad de la muestra es limitada. Las preocupaciones sobre las variantes emergentes del SARS-CoV-2 y otros patógenos virales respiratorios circulantes subrayan aún más la importancia de ampliar las pruebas de diagnóstico a la detección múltiple, ya que las de una sola unidad pueden no detectar (Akarapipad *et al.* 2022; Carpenter 2022) variantes emergentes y otros virus, mientras que la secuenciación resulta ser demasiado lenta y cara como herramienta de diagnóstico.

Las plataformas de pruebas moleculares múltiples rápidas permiten la detección precisa y simultánea de una amplia gama de patógenos virales simultáneamente (Clark *et al.* 2023). La extracción, amplificación y análisis de muestras pueden integrarse en plataformas de pruebas múltiples, dentro de procesos cerrados (*e. g.* cartuchos individuales), con diseño de «muestra a respuesta». Las pruebas rápidas de PCR multiplex con sistemas de muestra a respuesta brindan una oportunidad para la detección precisa de múltiples dianas respiratorias que presentan síntomas similares (es decir, sindrómicos), en menos de una hora. Los beneficios potenciales de los paneles rápidos multiplex incluyen el logro de una alta médica más temprana y un uso controlado de los antimicrobianos, y de las instalaciones de aislamiento.

La combinación de varias líneas de prueba en una sola tira permite la discriminación de las dianas a través de la resolución espacial, en pruebas que requieren el análisis simultáneo de más de un analito en un solo ensayo. Es la forma más directa de aumentar la capacidad de detección y, al mismo tiempo, conservar las ventajas de los sistemas LFIA (inmunoensayo de flujo lateral) individuales (Budd *et al.* 2023; Nan *et al.* 2023). Se han ideado ensayos múltiples para identificar las variantes del SARS-CoV-2 (Aloraij *et al.* 2023; Dikdan *et al.* 2023, Liu *et al.* 2023a; Liu *et al.* 2023b; Wacharapluedadee *et al.* 2023). Un biosensor nanoplasmónico múltiple permite capturar la respuesta humoral en sueros contra múltiples antígenos (Fumari *et al.* 2022). La detección nanoplasmónica se basa en el cambio de longitud de onda del pico de resonancia de plasmón superficial localizado (LSPR) de las nanoestructuras de oro tras las interacciones de unión entre los anticuerpos y los antígenos inmovilizados. Aquí, los antígenos se inmovilizan primero en diferentes áreas de detección mediante el uso de un sistema de monobiotinilación basado en la interacción de alta afinidad entre la biotina y la estreptavidina. La plataforma multiplex se valida detectando la presencia de 3 anticuerpos monoclonales contra 3 antígenos, 2 hemaglutininas (HA) diferentes de los virus de la influenza y el Spike RBD (dominio de unión al receptor) del SARS-CoV-2.

El virus SARS-CoV-2 continúa mutando y evolucionando rápidamente, dando como resultado muchas variantes y subvariantes. Estas variantes conllevan variadas mutaciones que confieren una mayor infectividad y evasión de la respuesta inmune. Muchas de las mutaciones están ubicadas en la proteína Spike (S). La detección de

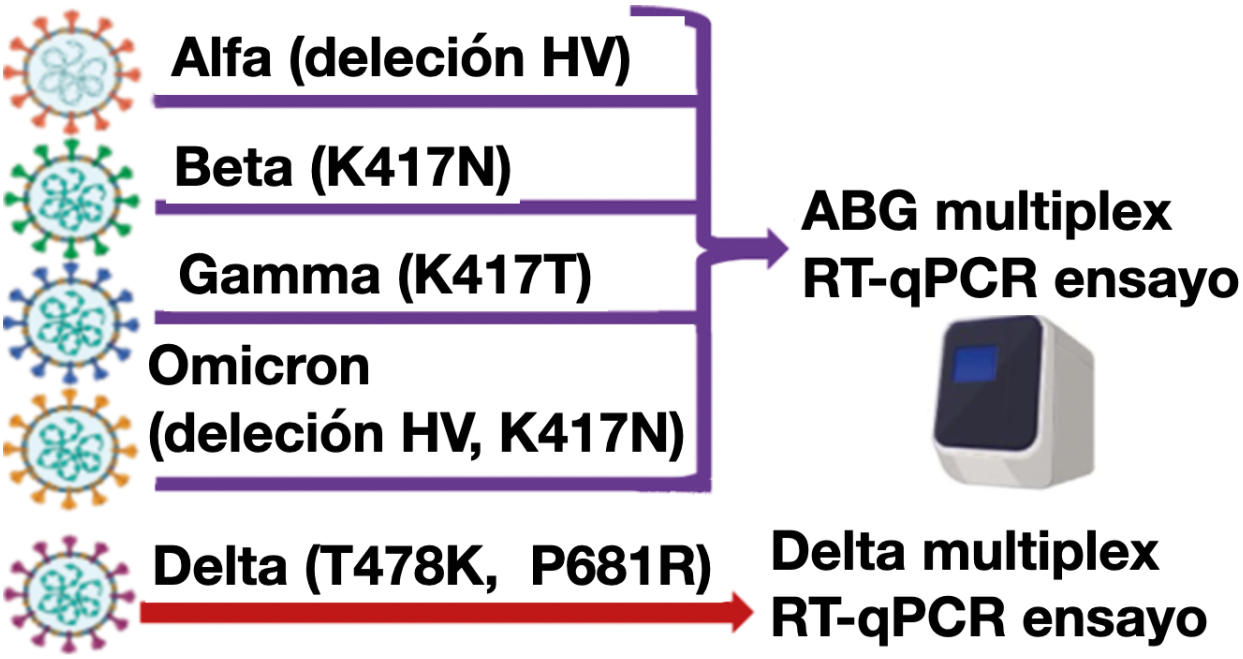


Figura 7. Ensayo multiplexor de las variantes del SARS-CoV-2 (Liu *et al.* 2023b). Fuente: American Chemical Society (ACS)

variantes del SARS-CoV-2 es un componente importante del seguimiento de la COVID-19. El desafío de las pruebas de detección dirigidas plantea la necesidad de actualizar y optimizar constantemente las dianas incluidas en los ensayos. Se eligen mutaciones objetivo que confieren una mayor infectividad y evasión de la respuesta inmune, que favorecen la supervivencia de nuevas variantes. Estas mutaciones se seleccionan de forma natural y pueden aparecer en futuras variantes del SARS-CoV-2.

Ensayos de RT-PCR cuantitativa múltiple para el SARS-CoV-2 identifican todas las variantes de preocupación, así como otras mutaciones de interés en el genoma viral, nueve mutaciones en total, utilizando (Dikdan *et al.* 2022) balizas moleculares discriminantes de un solo nucleótido. Los ensayos de baliza molecular de variantes presentados mostraron un límite de detección de 50 copias de ARN viral, con una especificidad del 100%. Al apuntar a cinco mutaciones en variantes preocupantes (Liu *et al.* 2023b), los ensayos de RT-qPCR multiplexados permiten la detección e identificación simultánea de las variantes Alfa, Beta, Gamma, Delta y Ómicron (fig. 7), así como a la discriminación de la subvariante BA.2 de Ómicron de otras subvariantes de Ómicron, aplicándose los ensayos a muestras clínicas y de aguas residuales.

Un ensayo multiplexor portátil, rápido y preciso, en formato de microarrays (Liu *et al.* 2023b) permite la detección, mediante amplificación isotérmica y fluorescencia en el infrarrojo cercano mejorada con oro plasmónico, de variantes del SARS-CoV-2, siendo apto para su aplicación en puntos de atención (POC). El ensayo, que tiene especificidad de un solo nucleótido para la discriminación de variantes, sensibilidad de copia única de ARN y no requiere extracción de ARN, discriminó 12 linajes de SARS-CoV-2 (en tres puntos críticos mutacionales de la proteína Spike) y detectó el virus en hisopos nasofaríngeos.

Un sistema multiplexor de código de barras de puntos cuánticos apunta a regiones conservativas de tipo silvestre y mutadas del SARS-CoV-2 (Kozlowski *et al.*), identificando sus cepas variantes a partir de una sola prueba de diagnóstico. El sistema detecta diferentes tipos de secuencias, incluidos genes conservados, eliminaciones de nucleótidos y sustituciones de un solo nucleótido. Combinado con teléfonos inteligentes puede adaptarse al seguimiento de mutaciones virales en tiempo real en el punto de atención.

15. BIOMARCADORES

Los biomarcadores (Ortega 2010; Semiz *et al.* 2022; Yadav *et al.* 2021; Zhang y Guo 2020) son sustancias que indican el estado biológico. Se utilizan para detectar enfermedades o sus procesos. Se miden y evalúan objetivamente como indicación de un proceso biológico común, estado patogénico o en respuesta a un tratamiento médico. Entre los de importancia clínica, junto a los genes virales, proteínas virales, y anticuerpos humanos contra proteínas virales, se encuentran los metabolitos expresados por los afectados por la COVID-19, *e. g.*, citoquinas, especies oxígeno-reactivas (ROS), proteína C-reactiva, proteína amiloidea A sérica, lactato deshidrogenasa, dímero-D, etc.

Los biomarcadores de la COVID-19 severa pueden clasificarse (Arturi *et al.* 2023; Faham *et al.* 2023; Hufnagel *et al.* 2023; Khaksarinejad *et al.* 2022; Madhurantakam *et al.* 2022; Papadopoulou *et al.* 2022; Pinheiro *et al.* 2021; Smail *et al.* 2023; Sundeep *et al.* 2023; Sweet *et al.* 2023; Vásquez y Orozco 2023) en inflamatorios, hematológicos, endoteliales, bioquímicos y de otra naturaleza. La inflamación es un fenómeno crucial en un sistema inmune sano presto para la lucha contra la infección. Una respuesta anormal del sistema inflamatorio puede conducir a disfunciones orgánicas tales como daño severo de la célula, funcionamiento irregular de múltiples sistemas, disfunción de órganos, o incluso muerte.

La interleukina-6 (IL-6) es una citoquina multifuncional, glicoproteica, segregada por las células T y que ayuda a las células B a madurar los anticuerpos. Está implicada en varios procesos inmunomoduladores e inflamatorios y es uno de los principales indicadores de COVID-19 severa. La proteína-C-reactiva (CrP), pentamérica, no específica, pertenece a la familia de la pentraxina. Es un biomarcador que se encuentra en la corriente sanguínea, producida por las células del hígado en respuesta a la inflamación en el transcurso de la infección. La procalcitonina (PCT) es un precursor de la hormona calcitonina expresada por las células debido a infección o lesión. Es un biomarcador de infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior y sepsis. La ferritina (FT) es una metaloproteína que almacena Fe^{3+} y libera Fe^{2+}, esencial en la regulación (homeostasis) del contenido de hierro del cuerpo y estrés oxidativo y anemia. Más recientemente ha sido asociada con infecciones virales por SARS-CoV-2. Un biomarcador nuevo y menos conocido es LIGHT, una citoquina codificada por el gen TNFSF14, de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, que desempeña un papel determinante en la regulación de la respuesta inmune. Estimula las respuestas de las células T y B, induciendo (Zhang y Guo 2020) la liberación de otras citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), e impulsando la tormenta de citoquinas.

La COVID-19 se manifiesta con alteraciones hematológicas como leucocitosis, leucopenia, eosinopenia, neutrofilia y trombocitopenia (bajos niveles de glóbulos blancos y de linfocitos, elevados niveles de lactato deshidrogenasa, disminución significativa de linfocitos T y aumento de neutrófilos). Una elevada relación de neutrófilos a linfocitos se identifica como un biomarcador de la COVID-19.

Los biomarcadores bioquímicos, incluidos el dímero D, la troponina cardíaca (cTn) y la LDH, se han vuelto de gran interés en la progresión y el seguimiento de la COVID-19, porque están ampliamente asociados con una mayor susceptibilidad a enfermedades graves y un alto riesgo de mortalidad. El dímero D se origina a partir de la lisis de la fibrina reticulada y es un indicador de la coagulación y la fibrinólisis. La cTn es una proteína relacionada con lesiones miocárdicas, que triplican el riesgo de mortalidad. La LDH es un indicador de daño tisular agudo en el corazón, el hígado, los pulmones, los músculos y los riñones.

Otros biomarcadores se han asociado con casos graves de COVID-19, pero se informan con menos frecuencia que los descritos anteriormente, aunque podrían proporcionar un enfoque más personalizado para predecir y tratar la enfermedad. Entre estos se encuentran la creatina quinasa (CK), la bradicinina (BK), los miARN (Mimmi *et al.* 2023; Pollet *et al.* 2023), la testosterona e incluso la microbiota pulmonar. Diferentes biomarcadores como los mencionados se expresan de forma diferente (Vásquez y Orozco 2023) en cada individuo. La CK es una enzima presente en diferentes tejidos corporales que actúa como biomarcador de daño muscular. BK es un péptido responsable de regular la presión arterial. Sus niveles aumentan con el aumento de ACE2, generando una tormenta de bradicinina, que puede generar manifestaciones características de COVID-19 como síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), inflamación y edema. Los microARN son ARN no codificantes que regulan la expresión postranscripcional en diversos procesos como la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación. Pueden alterar la expresión de ACE2 y TMPRSS2 (serina-proteasa transmembranas de tipo 2) durante la COVID-19 y modular la respuesta inmune a la enfermedad. La microbiota pulmonar es significativamente diferente entre pacientes con y sin SDRA. Esta microbiota modula el sistema inmunológico.

Se ha ideado un dispositivo sensor (Beduk *et al.* 2021) basado en un nanomaterial híbrido con capacidades multiplexora para la detección y monitorización en aliento de mezclas de biomarcadores compuestos orgánicos volátiles específicos de la COVID-19. Se ha llevado a cabo la detección de biomarcadores relacionados con COVID-19 mediante sensores electroquímicos, *e. g.* Vásquez y Orozco (2023) en el contexto de medicina personalizada. Los biomarcadores hematológicos en Covid persistente (Abdullah *et al.* 2023; Espin *et al.* 2023; Lai *et al.* 2023; Sundeep *et al.* 2023) han sido objeto también de reciente atención. El síndrome del COVID prolongado o Post-COVID puede que siga afectando a una proporción muy elevada de los pacientes que sufrieron la enfermedad, requiriendo (Martin Sánchez *et al.* 2023; Tsilingiris *et al.* 2023) recursos diagnósticos y terapéuticos combinados.

16. DISPOSITIVOS DE PUNTOS DE ATENCIÓN (POC)

Los métodos convencionales de detección se llevan a cabo en laboratorios clínicos bien equipados con la ayuda de equipos sofisticados, y personal bien capacitado. Procedimientos preanalíticos, *e. g.* tiempos de transporte prolongados, pueden influir sobre los resultados de las pruebas y retrasar los tiempos de respuesta. Esto perjudica notablemente el control de enfermedades infecciosas en áreas con recursos limitados. Se han destinado importantes fondos a la puesta a punto de métodos de diagnóstico rápidos y portátiles que eviten el transporte de muestras, y que permitan realizar pruebas inmediatas en muestras como saliva o hisopos nasales anteriores (que no requieren personal cualificado para su toma), en áreas con escasos medios en muestras como saliva o hisopos nasales anteriores.

La gestión de brotes queda así facilitada al proporcionar resultados rápidos, *e. g.*, en el nivel de atención primaria (clínicas ambulatorias) o de urgencia (hospitalaria), centros de atención a personas mayores, salas de emergencia, aduanas, hogar u otros entornos. La prueba doméstica del SARS-CoV-2, es una forma eficaz de saber si uno está contagiado, evitando así la autoevaluación infecciones cruzadas indeseables al acudir a las consultas médicas. Los dispositivos de pruebas en el punto de atención (POC), muchos de los cuales son portátiles, de bajo costo, y rápidos, han sido diseñados para promover la gestión de la salud, controlar la propagación de enfermedades y mejorar el pronóstico de los pacientes. Estas herramientas POC orientadas a la detección del SARS-CoV-2 son necesarias para responder a los brotes y satisfacer los cuidados de autocontrol de los ciudadanos.

Los dispositivos POC no sustituyen a las pruebas de laboratorio más elaboradas en la detección de la COVID-19, aunque suministran un medio de detectar de forma rápida la enfermedad en ambientes distantes del laboratorio central, entre los que se incluyen la consulta médica, la ambulancia, el hogar y lugares remotos (Asuero 2022; Everitt *et al.* 2021; Canciu 2023; Fragkou *et al.* 2023; Heggestad *et al.* 2023; Hou *et al.* 2023; Karuppaiah *et al.* 2023; Kumar *et al.* 2022a; Luo *et al.* 2023; Madhurantakan *et al.* 2022; Qin *et al.* 2022; Salgado Fernandes *et al.* 2022; Seok *et al.* 2023; Shang *et al.* 2023; Yadav *et al.* 2021). El diagnostico supone un rol primordial en el entorno sanitario y su grado de fiabilidad y precisión ejercen una influencia trascendental sobre la toma de decisiones clínicas, el tratamiento y la tasa de supervivencia del paciente: «Without diagnosis, medicine is blind». En el momento presente los métodos de detección de SARS-CoV-2 con POC pueden dividirse (Song *et al.* 2021a) en tres categorías: ensayos de ácido nucleico (Wilner *et al.* 2023), inmunoensayos (Hou *et al.* 2023) y ensayos con biosensores (Govri *et al.* 2021; Karuppaiah *et al.* 2023; Madhurantakam *et al.* 2022).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) perfilaba en 2003 los criterios (fig. 8) considerados esenciales (Mabey *et al.* 2004) de los ensayos POC compendiados en el vocablo ASSURED: asequibilidad (**A**ffordable), sensibilidad (**S**ensitivity), especificidad (**S**pecificity) (specify), facilidad de uso (**U**ser friendly) (fácil de usar en pocos pasos con entrenamiento mínimo), robusto y rápido (**R**apid & Robust) (resultados disponibles en menos de 30 minutos, sin equipo (**E**quipment free) y entregables (**D**eliverable to end users) a quienes lo necesitan. Estas características constituyen una referencia para juzgar si el diagnóstico satisface el requisito de entornos con recursos limitados. Sin embargo, resulta difícil satisfacer todos los criterios enumerados de manera simultánea. Se han adicionado otros dos, **R** (real time connectivity; conectividad en tiempo real) y **E** (easy of specimen collection and environmental friendliness; facilidad de recolección de muestra y respeto al medio ambiente) dando lugar (Land *et al.* 2019; Sena-Torralba *et al.* 2022) al nuevo acrónimo REASSURED. Se ha generado mucha preocupación en torno a la gran cantidad de plásticos no reciclables (Peeling y Sia 2023) utilizados en la fabricación de carcasas de pruebas rápidas, de ahí la inclusión de la última exigencia. La química verde de los ensayos de diagnóstico (El-Maghrabey *et al.* 2023) ha sido objeto de reciente de atención.

Uno de los problemas más importantes a resolver con un dispositivo POC de diagnóstico molecular es la preparación (simplificación) de la muestra. El futuro del diagnóstico viral radica en la descentralización, en la necesidad de disponer de POC que produzcan resultados en 5 minutos (tiempo de respuesta rápido), con bajo consumo de reactivos y muestras y no requiera de un equipo especial (saliva, anticuerpo, antígenos portátiles, tests kits, dispositivo de análisis por inmunofluorescencia, RT-PCR, RT-LAMP portátiles). El diagnóstico precoz es el pilar para iniciar la terapia más eficiente, acelerando en gran medida las decisiones (Erdem *et al.* 2022) sobre el tratamiento que salvan vidas, contribuyendo al control y la posible prevención de una pandemia emergente. RT-LAMP, *e. g.*, cuantifica copias de ARN del SARS-CoV-2 en hisopos nasofaríngeos, empleando rojo de fenol como indicador (Rioboó-Legaspi *et al.* 2024), cuyo potencial y coloración cambia con el progreso de la reacción. Las curvas de calibrado con copias del fragmento N1 suministran mejores resultados que con los fragmentos N o S. Esta metodología es innovadora, sensible, rápida y sencilla, lográndose avances hacia la descentralización total con el diseño y fabricación de un pequeño



Figura 8. Características de los dispositivos de punto de atención (POC) según lo sugerido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Madjurantakam *et al.* 2022). Fuente: American Chemical Society (ACS)

calentador portátil (procedimientos isotérmicos), obteniéndose resultados análogos a los de un ciclo térmico comercial de mesa de laboratorio.

El desarrollo de plataformas de detección POC implica la evaluación previa de necesidades clínicas y análisis de mercado, desarrollo de tecnología y análisis económico, pruebas de muestras suplementadas, producción de prototipos y ensayos clínicos, lo que conlleva años de investigación y una inversión financiera sostenida. A pesar de los extensos estudios llevados a cabo, el número de productos POC comerciales disponibles y ampliamente usados sigue siendo todavía limitado. Se han introducido en el mercado del diagnóstico *in vitro* varias plataformas POC miniaturizadas de diagnóstico/detección, que van desde ópticas y de fluorescencia hasta electroquímicas, aunque no cumplen con todos los criterios ASSURED, a excepción (Pei *et al.* 2023; Sun *et al.* 2024) de los ensayos inmunocromatográficos). Los futuros sistemas POC podrán utilizar un solo chip para lograr la detección multiplexada o incluso la detección con un alto rendimiento de diferentes biomoléculas con objeto de diagnosticar simultáneamente diferentes enfermedades a partir de señales de lectura altamente confiables y fácilmente distinguibles. Esto permitirá que los sensores POC sean verdaderamente eficientes en términos de tiempo, rentabilidad, rápida respuesta y fácil despliegue en zonas de escasos recursos.

Los teléfonos inteligentes, que ofrecen imágenes, filtrado y procesamiento de imágenes/datos, pueden ser herramientas poderosas para compensar las plataformas de diagnóstico POC actuales (Kim y Lee 2022; Zayed *et al.* 2023). Debido a que muchas personas siempre llevan consigo sus teléfonos inteligentes, estos pueden servir efectivamente como lectores portátiles que verifican de manera rápida y precisa (Sena-Torralba *et al.* 2022) las infecciones y contribuyen significativamente al control y a la vigilancia de enfermedades. Además, se espera que el rendimiento del diagnóstico mejore mediante la introducción de la inteligencia artificial (IA). Un sensor habilitado para IoTM (Interner de las Cosas Médicas) permite potencialmente cargar datos médicos relevantes a servidores en la nube 5G para análisis y almacenamiento de datos masivos (Big Data) para ayudar a comprender mejor (Ling y Chang 2023) las enfermedades y establecer soluciones de diagnóstico.

17. ROBOTS

El escritor checo Karel Čapek acuñó el término de robot, clásico de la ciencia ficción en la literatura y en el cine en las primeras décadas de siglo XX para describir las maquinas trabajadoras o serviles. Los robots asumen en la ficción papeles variados (Asuero 2023), desde fiel escudero (mítico C3PO) a robot cirujanos y aniquiladores

de la humanidad. La palabra «androide», entidad mecánica con apariencia antropomórfica (Atienza-Macias 2021), fue empleada en 1270 por San Alberto Magno (1193/1206-1280) y popularizada por el escritor francés Auguste Villiers de L'Isle-Adam (1838-1889) en la novela *La Eva Futura* (1886). Un término más sutil (Atienza-Macias 2021) es el de «sistemas ciberfísicos» (CPS) (UE 2016): «sistemas robóticos inteligentes, vinculado con el Internet de las Cosas, o sistemas técnicos de computadoras en red, robots e inteligencia artificial que interactúan con el mundo físico» (máquinas que interactúan directamente con el mundo que las rodea, ya sea a través de sensores, *i.e.* interacción con factores ambientales, o con personas, *i.e.* interacción con factores humanos).

Los robots se han utilizado en la industria desde la década de 1960 en las líneas de montaje de la General Motors (Tuisku *et al.* 2023), *e. g.* el primero de ellos, el Unimate (Zemmar *et al.* 2020). Los robots industriales no sustituyen por completo el trabajo humano, aunque modifican las condiciones laborales. Las necesidades de atención sanitaria evolucionan constantemente, como lo ha demostrado la COVID-19, y los robots contribuyen a aclimatarse (Morgan *et al.* 2022) a estos cambios. La pandemia de la COVID-19 ha alterado la manera en cómo los médicos interactúan con los pacientes y ha obligado a reestructurar los sistemas de prestación de la atención médica y a adaptarnos (Defi *et al.* 2022) a las tendencias y necesidades variables de los usuarios finales. Como resultado, los robots médicos ya no constituyen una opción, sino un elemento sustancial de la calidad de la atención médica. En los últimos años se ha implementado la robótica, la inteligencia artificial y la tecnología digital en hospitales y áreas públicas (Zhao *et al.* 2022b) para mantener el distanciamiento social, reducir el contacto personal, permitir un diagnóstico rápido, rastrear la propagación del virus de la COVID-19 y proporcionar servicios sanitarios.

Coincidente con la pandemia de la COVID-19 se ha producido un notable incremento en el número de las publicaciones sobre el uso de robots en la atención sanitaria, y se ha planteado la necesidad (Morgan *et al.* 2022) de que los robots desempeñen funciones en entornos hostiles y desfavorables. El desarrollo continuo de nuevas tecnologías y la perspectiva de que los robots alivien la carga de trabajo de la atención médica y mejoren los resultados en el tratamiento de los pacientes ha sido también un factor determinante en este auge. Se han aplicado estrategias innovadoras (Khan *et al.* 2021; Mbunge *et al.* 2020; Morgan *et al.* 2022; Schen *et al.* 2021), *e. g.* robótica, drones, e IA para contrarrestar la situación originada por la pandemia de la COVID-19. La tecnología ha demostrado su potencial en aspectos como la administración de medicamentos, la vigilancia, el cribado de pacientes y la desinfección.

Las tecnologías usuales incluyen (Thomas *et al.* 2021) teleoperación, robots de servicio autónomos (Teng *et al.* 2022; Wang *et al.* 2023a; Wang *et al.* 2023f), reconocimiento facial, escaneo térmico y otros sistemas inteligentes para reducir, controlar o diagnosticar el virus. Los robots de servicios sanitarios (Tuisku *et al.* 2023) también incluyen robots de telepresencia para crear una sensación de presencia física en un lugar remoto, así como robots desinfectantes, cuyo interés se ha intensificado debido a la pandemia de la COVID-19. Los robots son inmunes a las infecciones (Shen *et al.* 2021) y se desinfectan con facilidad. Muchas de las soluciones aportadas exigen todavía la supervisión humana.

Los robots sociales son diseñados específicamente para interactuar con los seres humanos en entornos físicos adecuados. Durante la pandemia de la COVID-19, los robots han actuado de forma segura en entornos que se han tornado peligrosos y adversos. Los robots sociales, en concreto, han mostrado ser decisivos (Aymerich-Franch y Ferrer 2022) para minimizar las transmisiones intrahospitalarias al realizar funciones de seguimiento o facilitar la teleoperación para conectar a los médicos con los pacientes.

Los drones se emplean también en la detección y el monitoreo en los sectores de locomoción, atención médica, desinfección y logística. Con la incorporación simultánea de algoritmos de aprendizaje automático e inteligencia artificial (AI, artificial intelligence), los robots resultan ser más efectivos (Tuisku *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023a; Wang *et al.* 2023f) en el tratamiento y diagnóstico de infecciones (detección masiva y adquisición de datos para interpretación de informes de salud, realización de tareas repetitivas con escaso margen de error). Los servicios de telemedicina (Sikander *et al.* 2023), ayudan a disminuir el riesgo de contagio de la COVID-19 al reducir el número de personas que deben acudir al hospital, teniendo éxito tanto en situaciones de emergencia, como en chequeos de rutina. El término telemedicina fue introducido en 1970 por Thomas Bird, del latín «medicus» y griego «tele» con el significado de curar a distancia, siendo aplicada desde el Hospital General de Massachussets de Boston a los empleados del aeropuerto en el Logan Airport. Willem Einthoven (1860-1927) médico y fisiólogo neerlandés (Khan *et al.* 2022), describió en 1906 el primer electrocardiógrafo en su laboratorio de Leiden.

La utilización de la telemedicina ha aumentado significativamente (Sikander *et al.* 2023) durante la pandemia de COVID-19. Constituye una forma segura de acceder y brindar servicios de atención médica tanto a

los pacientes como a los médicos y otros profesionales del entorno de la salud. Los dispositivos médicos accesibles de forma remota desempeñan un papel integral en la prestación de estos servicios. Los avances tecnológicos de estos dispositivos de telemedicina se han aplicado a la cirugía, el diagnóstico, el seguimiento de la enfermedad y la consulta médica.

Aunque el coste de los robots es elevado, la crisis de la pandemia ha forzado en cierto grado (Faham *et al.* 2023; Kalasin y Suraeugchai 2023; Wang y Wang 2021) la transformación digital. La innovación tecnológica está desempeñando un papel destacado en el «nuevo enfoque» de Salud 4.0 y ciertamente ofrece soluciones sugerentes para las respuestas hospitalarias a futuros brotes epidémicos o pandémicos. El cambio en la atención sanitaria impulsado por la Salud 4.0 se basa en la integración del Internet de las Cosas, la Computación en la Nube y en la Niebla y el Big Data (Piaggio *et al.* 2023). La automatización, las herramientas digitales y los robots pueden desempeñar un papel clave en el control y prevención de la infección en entornos de atención, por lo que deben aprovecharse las posibilidades que prestan para garantizar un papel decisivo en este sentido. ODIN, uno de los mayores proyectos pioneros de Horizonte 2020 en el campo de la robótica aplicada a la atención sanitaria, está apuntando en esa dirección, con el objetivo de mejorar la seguridad, la productividad y la calidad de los hospitales incorporando las tecnologías basadas en inteligencia artificial. De cara al futuro es importante acoplar las tecnologías avanzadas de IA y de 5G con objeto de mejorar la flexibilidad y funcionabilidad de los robots y cotejar consideraciones de coste y producción para facilitar el acceso a las soluciones robóticas.

18. SECUENCIACIÓN DE PRÓXIMA GENERACIÓN (SECUENCIACIÓN METAGENÓMICA DE PRÓXIMA GENERACIÓN [MNGS])

La secuenciación de próxima generación (NGS) ha revolucionado la genómica expandiendo nuestro conocimiento de la estructura, función y dinámica del genoma (LeMieux 2020; Sutai *et al.* 2023) facilitando los estudios de transcriptómica, epigénetica, metagenómica y otras óhmicas. La NGS ha probado ser indispensable durante la reciente pandemia de la COVID-19 en la que (Nellimarla y Kesanajurti 2023) el progreso del descubrimiento del patógeno al desarrollo de la vacuna se ha hecho en un tiempo récord. La generación de importantes conjuntos de datos de secuenciación por parte de NGS brinda oportunidades para abordar nuevos desafíos en áreas clínicas, incluidos agentes infecciosos, desarrollo de vacunas y aspectos relacionados con la seguridad de productos

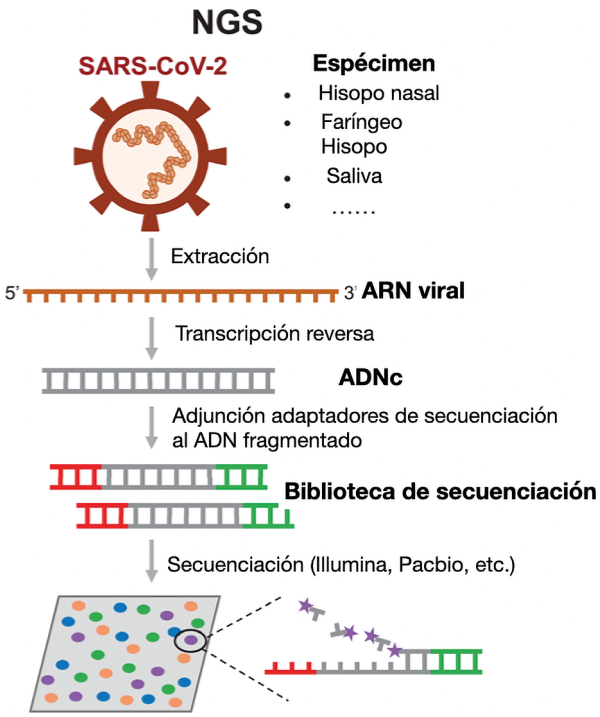


Figura 9. Ilustración esquemática del principio de ensayo de NGS (Xu *et al.* 2020). Fuente: Ed. Wiley

farmacológicos terapéuticos biológicos, como las pruebas de agentes adventicios.

La secuenciación genética (fig. 9) del patógeno es fundamental para su precisa y completa identificación (Carpenter *et al.* 2022; Chiara *et al.* 2021; Satam *et al.* 2023; Xu *et al.* 2020). En adición, facilita la puesta a punto de pruebas de diagnóstico molecular efectivas, contribuyendo además al desarrollo de tratamientos y vacunas. Los científicos chinos (Chen *et al.* 2020) completaron la identificación y el análisis del genoma del SARS-CoV-2 en solo cinco días, ubicando el nuevo virus en el árbol de la diversidad de los virus conocidos. El análisis filogenético conduce a una nueva cepa de ARN perteneciente a la familia *Coronaviridae*, designado como SARS-CoV-2 por la similitud y coincidencias con el genoma del SARS-CoV existente.

Las muestras clínicas utilizadas para la secuenciación del SARS-CoV-2 incluyen hisopos nasofaríngeos, esputo y líquido de lavado broncoalveolar. El proceso básico (Kumar *et al.* 2022c; Nellimaria y Kesanakurti 2023; Pervez *et al.* 2022) consta de cinco etapas: i) extracción del ARN viral; ii) construcción de una base de datos (biblioteca) de información genética del virus; iii) secuenciación de alto rendimiento; iv) análisis filogenético del genoma completo generado; e v) interpretación de la información biológica, con lo que se identifica si la secuencia del genoma es homóloga al SARS-CoV-2, a través de análisis comparativo de las bases de datos. Sobre

unas 16.639.888 secuencias del SARS-CoV-2 han sido recogidas y almacenadas a fecha de 1 de abril de 2024 en la base de datos GISAID (https://gisaid.org) (Global initiative on sharing all influenza data, establecida en 2008).

La secuenciación genómica (Cuevas-Ferrando *et al.* 2024; John *et al.* 2021; Kumar *et al.* 2022c) permite: i) rastrear la fuente de infección, evaluar la evolución del SARS-CoV-2 durante la transmisión y realizar el seguimiento epidemiológico de sus movimientos; ii) excluir eficazmente otros patógenos; iii) identificar múltiples patógenos existentes en un solo paciente, lo que ayuda a implementar tratamientos razonables. La secuenciación de próxima generación (NGS), como el perfil del genoma viral completo NGS mutagénico basado en amplicones, permite el cribado de una gran cantidad de muestras.

La mNGS tiene limitaciones (Carpenter *et al.* 2022): es un procedimiento complejo, con tiempos de análisis prolongados (de 24 a 48 h), susceptible a la contaminación del genoma del huésped, que requiere de una elevada cualificación del personal (profesional bioinformático) con respecto a la adquisición y el análisis de datos, y utiliza reactivos químicos y equipos costosos. Estas circunstancias restringen su uso en el diagnóstico de laboratorio de rutina. Las oportunidades y desafíos inherentes a la adopción de la NGS como prueba de diagnóstico (Dong *et al.* 2023) del SARS-CoV-2 ha sido objeto de estudio reciente.

La secuenciación de Sanger ha dado paso (Pervez *et al.* 2022; Satam *et al.* 2023) a la secuenciación de alto rendimiento de segunda generación, capaz de llevar a cabo millones de reacciones de secuenciación de forma simultánea (Illumina, IonTorrent), y de tercera generación (Pacific Biosciences, Oxford Nanopore), capaces de secuenciar moléculas de ADN sin amplificación previa, y sin necesidad de seguir la estrategia se secuenciación por síntesis de los métodos de segunda generación. Estas estrategias brindan (CDC 2023) una variedad de herramientas para sondear los genomas con mayor profundidad, lo que conduce a una mejor comprensión de cómo las variantes de la secuencia del genoma subyacen al fenotipo y la enfermedad. Las implicaciones de la NGS en la medicina personalizada y en la farmacogenética son obvias (Rabbani *et al.* 2016).

La secuenciación genómica se puede realizar utilizando muestras recolectadas para pruebas de PCR. Esto raramente está indicado para el tratamiento de pacientes individuales, pero puede ayudar a diferenciar (Meumann y Robson 2023) la recaída de la infección o en la detección de mutaciones asociadas con la resistencia a la farmacoterapia. A nivel de paciente individual es más relevante para pacientes inmunodeprimidos en ambientes hospitalarios.

19. USO DE PSEUDOVIRUS

La pandemia de COVID-19 ha estimulado fuertemente el estudio de los virus con objeto de desarrollar formas rápidas y seguras de su detección en el cuerpo humano, estudiar las interacciones virus-anticuerpo y virus-célula y diseñar nanoportadores para uso (Andrzejewska *et al.* 2023) en las terapias antivirales orientadas a dianas específicas. El pseudovirus es un virus sintético que tiene la infectividad del virus original y puede simular todo el proceso de unión del virus al receptor y de entrada viral, pero no puede replicarse. La transfección de células con un plásmido que contiene (Chen *et al.* 2023a; Chen *et al.* 2021; Tan *et al.* 2023) la proteína de la membrana externa viral con otro plásmido que contiene el esqueleto viral es el método utilizado con frecuencia en la construcción de pseudovirus. Estas especies contienen en lugar de cápsides con ADN/ARN viral núcleos vacíos o sintéticos con proteínas virales reales. Se utilizan habitualmente tres sistemas de empaquetado viral para producir pseudovirus: vectores lentivirales basados en vectores del virus de la inmunodeficiencia humana, vectores del virus de la estomatitis vesicular y vectores del virus de la leucemia murina.

El uso de pseudovirus que expresan la proteína S del SARS-CoV-2 en lugar del virus en sí supone una gran oportunidad para simplificar y acelerar (Li y Chang 2023) el desarrollo de ensayos para proteínas virales. Los pseudovirus, como hemos visto, son partículas virales recombinantes (Chen y Zhang 2021; Xiang *et al.* 2022) que contienen el núcleo o esqueleto y las proteínas envolventes adquiridas de dos virus diferentes. La pseudotipificación implica el intercambio de una proteína de unión viral con un virus diferente (Feng *et al.* 2020), por ejemplo, la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la empleada habitualmente en los vectores retrovirales y lentivirales.

El sistema de pseudovirus ha potenciado en gran medida la investigación del SARS-CoV-2 y desempeña un papel importante en (Xiang *et al.* 2022) el estudio del mecanismo de unión y reconocimiento del virus con los receptores celulares, en el cribado de fármacos y en la evaluación de anticuerpos monoclonales y títulos de vacunas. Cuando se producen mutaciones que podrían mejorar la capacidad de transmisión y promover el escape inmunológico, y es difícil aislar la cepa mutante del virus vivo, puede recurrirse a la edición de genes, tecnología que realiza mutagénesis con el propósito de obtener mutaciones de un solo punto o de múltiples puntos en proteínas de la envoltura, en pseudovirus, y estudiar su función. Disponer de virus desactivados u objetos similares a virus de uso seguro, que imiten virus reales y permitan llevar a cabo los estudios en laboratorios BSL-2 reviste una importancia fundamental.

Partículas portadoras de núcleos de Au rodeados por «coronas» de dominio S1 de la proteína del pico del virus interactúan de forma específica con los anticuerpos del SARS-CoV-2 y son seguras de utilizar (Andrzejewska *et al.* 2023). Los núcleos de Au exhiben resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR), lo que hace que las partículas sintetizadas sean adecuadas para la biodetección. Mediante autoensamblaje modular se diseñan nanopartículas oligoméricas solubles, esféricas, homogéneas, de elevada pureza, de naturaleza similar al amiloide, estables, biocompatibles y con una elevada relación superficie/volumen (OligoBinders), decoradas con dos miniproteínas (Behabahanipour *et al.* 2023) descritas previamente para unirse al RBD de la proteína S con alta afinidad. Una nanopartícula de pseudovirus (PVNP) que muestra los dominios (Xia *et al.* 2023) de unión al receptor (RBD) del pico del SARS-CoV-2, denominada S-RBD, se ha postulado como candidata a vacuna contra la COVID-19. El PVNP es altamente inmunogénico y provoca títulos elevados de IgG específica de RBD y anticuerpos neutralizantes en ratones.

Los esfuerzos para mitigar los efectos del SARS-CoV-2, como la vacunación masiva y el desarrollo de terapias monoclonales, requieren mediciones precisas, rápidas, seguras y fáciles de usar, en laboratorios BSL-2, de anticuerpos neutralizantes funcionales que bloqueen la infección por el virus lo que permite evaluar el estado inmunológico de la población tras la vacunación o infección. Las terapias basadas en anticuerpos neutralizantes son prometedoras (Liu *et al.* 2023a) en una variedad de prácticas, que abarcan la profilaxis y el tratamiento de enfermedades infecciosas agudas. Los ensayos de neutralización pueden detectar anticuerpos que inhiben la infección viral, neutralizándolos (Chen y Zhang *et al.* 2021; Chilin *et al.* 2023; Hetrick *et al.* 2022). Los resultados se observan detectando los efectos citopáticos de la replicación viral en líneas celulares. Estos ensayos, desempeñan un papel crucial en el uso clínico del plasma de convalecencia y, a largo plazo, en el desarrollo de vacunas. Actualmente, se utilizan muchas pruebas confiables de neutralización de pseudovirus para detectar anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2, y estas pruebas permiten determinar el título de partículas infectadas y evaluar la función de las proteínas virales (Feng *et al.* 2023; Hickerson *et al.* 2023; Li *et al.* 2023; Liu *et al.* 2023a; Sun *et al.* 2022).

Se ha puesto a punto un ensayo de neutralización (Izac *et al.* 2023) basado en el virus de la estomatitis vesicular con dos métodos de lectura, imágenes y citometría de flujo, correlacionándose los resultados con los obtenidos mediante ensayos de serología y neutralización previos. Se han generado virus pseudotipados portadores de la proteína de pico del SARS-CoV-2 de las cepas Wuhan-Hu-1/D614G, tipo natural o silvestre (wild type, WT), B.1.617.2 (Delta) o B.1.1.529 (Ómicron) para evaluar la actividad de los anticuerpos neutralizantes mediante un ensayo de neutralización (D'Apice *et al.* 2022) basado en pseudovirus, correlacionándose los resultados obtenidos con la prueba de microneutralización basada en virus vivos (estándar de oro). Se ha empleado un pseudovirión híbrido alfavirus-SARS-CoV-2 (Ha-CoV-2) para la cuantificación rápida y precisa (Chilin *et al.* 2023) de medicamentos antivirales, variantes del SARS-CoV-2 y sus respuestas a los anticuerpos de neutralización. Ha-CoV-2 es una partícula similar al virus SARS-CoV-2 que no se replica y está compuesta por proteínas estructurales del SARS-CoV-2 (S, M, N y E) y un genoma derivado de un alfavirus de expresión rápida.

Los pseudovirus tienen sus limitaciones: solo pueden usarse en el estudio de virus con una proteína de envoltura específica (virus de la influenza, coronavirus, retrovirus, virus del Ébola...). El funcionamiento del sistema es complejo para virus sin proteína de envoltura, como el rotavirus y el poliovirus. Las características simuladas por los pseudovirus también son muy limitadas, en comparación con la de los virus vivos. En general solo pueden simular el papel de la proteína de la envoltura del virus vivo en la mediación del virus en la célula *in vitro*. El proceso de proliferación y liberación después de ingresar a la célula no se puede simular. Además, la forma de las partículas virales puede afectar la aplicabilidad de los pseudovirus producidos. Por ejemplo, el SARS-CoV-2 es un virus esférico y la proteína S cubre dos estados diferentes antes y después de la fusión. Por tanto, la distribución, la conformación y el patrón de densidad de las glicoproteínas virales heterólogas en los pseudovirus pueden no reflejar su estado «natural» en la superficie de los virus vivos. Para superar las deficiencias de los pseudovirus, muchos grupos de investigación han desarrollado una tecnología de clonación de ADNc infeccioso del SARS-CoV-2.

20. IOT/IOMT: MEDICINA DE PRECISIÓN

La Internet de las Cosas (IoT) es una colección de dispositivos, seres humanos, objetos y servicios interconectados (Arowo *et al.* 2023; Capella *et al.* 2020; Li *et al.* 2024a; Mayer y Baeumner 2019; Yang *et al.* 2022) que comparten datos para lograr un objetivo común en diferentes áreas y aplicaciones. IoT se utiliza en muchos dominios diferentes, como la atención médica, la agricultura, el transporte, y la distribución y producción de energía. La integración de tecnologías con dispositivos móviles (teléfonos inteligentes) brinda nuevas oportunidades (Asuero 2022) en variadas áreas. En el campo del diagnóstico médico, representan un cambio de paradigma que permite (Umair *et al.* 2021) la provisión de

atención médica móvil y medicina personalizada (Min *et al.* 2023; Zhao *et al.* 2022a; Yang *et al.* 2023a). Tanto AI como IoT / IoMT (Internet de las cosas / Internet de las cosas médicas) pueden combinarse con, *e. g.,* inmunosensores, para prevenir y manejar la COVID-19, brindando enfoques específicos y sensibles cada vez más rápidos y económicos a través de la administración de bases de datos, intercambio y análisis en red (Alavi 2022; Ehtesabi y Afzalpour 2023; Kumar 2022a; Madhurantakam *et al.* 2022; Vázquez y Orozco 2023).

En el proceso de estandarización de la tecnología 5G (Alhayani *et al.* 2023; Devi *et al.* 2023; Javaid *et al.* 2023; Moglia *et al.* 2022; Santiña 2022; Suleiman y Adinoui 2023; Zhou 2021) se examinan tres áreas: comunicaciones masivas tipo máquina, banda ancha móvil mejorada, y comunicaciones ultra confiables y de baja latencia. A pesar de sus beneficios adicionales, las redes 5G todavía tienen limitaciones significativas en las capacidades de tráfico móvil, la densidad de dispositivos y la latencia requerida para la atención médica y otras aplicaciones en general. Se prevé que las futuras redes de IoT habilitadas para 6G sirvan para aplicaciones de atención médica inteligentes con latencia ultra-baja, alto rendimiento, confiabilidad ultra-elevada, alta densidad y eficiencia energética.

La atención médica inteligente del futuro incluirá una combinación de 6G e Internet de las cosas (IoT) que abordará las limitaciones actuales (Ahad y Thair 2023; Ahmad *et al.* 2023; Lin y Chang 2023; Nasralla *et al.* 2023) relacionadas con la cobertura celular, el rendimiento de la red y los problemas de seguridad. Nuevos sistemas de detección de la COVID-19 de forma remota basados en IA e IoT / IoMT y la combinación de varios sensores médicos inteligentes (sensores de pulso, térmicos y sanguíneos) están actualmente bajo escrutinio y estudio. Estos sistemas de plataformas de diagnóstico «en línea» recopilan datos invaluables de los pacientes de forma remota y los suben a la nube. Así, los médicos tienen acceso a ellos en tiempo real. Caminamos en la dirección correcta hacia el paradigma revolucionario de la medicina de precisión (Asuero 2022; Biswas *et al.* 2022; Cen *et al.* 2023; Equils *et al.* 2023; Dash y Kundu 2023; Manochio *et al.* 2023; Mostafavi *et al.* 2022; Orozco 2023; Vlasova-St Louis *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023a; Yu *et al.* 2023a). Se logra un rápido desarrollo en la industria de la IoT debido tanto a la red de sensores inalámbricos (Wireless sensor networks, WSN) que permite la comunicación entre dispositivos y a la identificación por radiofrecuencia (Radio-frequency identification, RDF), que permite el etiquetado de dispositivos (Ali *et al.* 2023; Aski *et al.* 2023; Dwivedi *et al.* 2022).

Los avances en la Industria 4.0 incluido el IoT, las redes móviles, la computación en la nube y la AI hacen posible la conexión de los pacientes con los profesionales de la salud (Ali *et al.* 2023; Haleem *et al.* 2022; Inuwa *et al.* 2022; Karatas *et al.* 2022; Loeza-Mejía *et al.* 2021; Sood *et al.* 2022: Yadav *et al.* 2021). Esto puede aplicarse en la prevención del contagio, mejora del diagnóstico, promoción de entornos virtuales de aprendizaje y oferta de servicios a distancia. Todo esto plantea problemas de índole ética, técnica, de seguridad y legal (Kumar *et al.* 2023; Qahtan *et al.* 2023; Thapa *et al.* 2023). En el futuro, las tecnologías de la Industria 4.0 se aplicarán para almacenar datos confidenciales de nuestro sistema de atención médica (Javaid *et al.* 2023) que podrán usarse para otra pandemia similar como la COVID-19. Esta revolución podría ser adoptada rápidamente por los profesionales, los médicos y el personal que pueden influir en la línea de tratamiento de COVID-19 y otras pandemias o epidemias similares. Puede utilizarse para centralizar todas las herramientas, dispositivos y procesos de tratamiento médicos. En la figura 10 se muestra una representación de sensores de telemedicina para COVID-19 y biosensores periféricos que comparten datos y análisis de datos en la nube.

La realidad aumentada (AR) y la realidad virtual (VR) constituyen (Walker *et al.* 2023) aportaciones novedosas (*e. g.*, puede ayudar a simular el SARS-CoV-2 de forma visual) para explorar las condiciones médicas y mejorar el diagnóstico visual. Esta noción de tecnología inmersiva se propuso por primera vez (Ahmad *et al.* 2023) en la década de 1960, cuando Ivan Sutherland (1938-), norteamericano, padre de la computación gráfica, creó los primeros auriculares. En 1975, el también estadounidense Myron Krueger (1942-), científico de la computación reconvertido en artista informático, diseñó un «Videoplace», combinación de cámaras de video y proyectores para construir un mundo de realidad virtual. La inteligencia artificial y la visión por computadora pueden aplicarse para mejorar la experiencia de los proveedores de atención médica y ofrecer entornos personalizados para la enseñanza clínica.

La comunicación holográfica (Ahad y Tahir 2023) será una de las aplicaciones más útiles para el alto rendimiento de 6G, al igual que la realidad virtual y aumentada (AR/VR) lo es para 5G. Las aplicaciones de atención médica que utilizan 6G mejorarán las experiencias de realidad virtual y aumentada al comunicar información sensorial adicional de diversas fuentes, como audio, visual, somatosensorial y háptica, proporcionando interacción en tiempo real y presentando con precisión imágenes 3D de objetos virtuales y reales. Esto permitirá a los médicos examinar de forma remota áreas específicas del cuerpo, lo que proporcionará una mejor visibilidad y será útil en caso de procedimientos o cirugías complejas de alto riesgo.

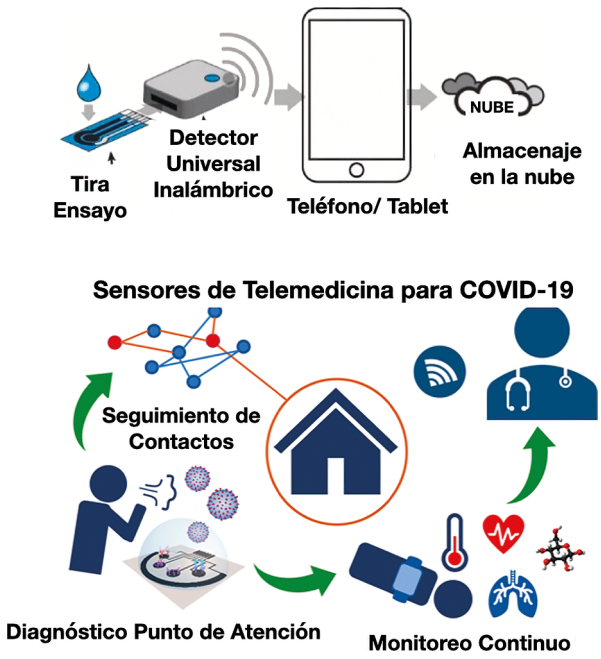


Figura 10. Implementación conforme a los recientes avances tecnológicos de los sensores de COVID-19. Biosensores periféricos que comparten datos en la nube (Lukas *et al.* 2020; Laghrib *et al.* 2021). Fuente: American Chemical Society (ACS) y Ed. Elsevier

21. BIOSENSORES

A lo largo de este capítulo hemos venido haciendo alusión a los biosensores, introduciéndolos de forma transversal en los diversos apartados. Vamos en este a incidir en el tema con algo más de detenimiento. En los casos de pandemia existe una necesidad urgente de realizar pruebas diagnósticas extensas (más fáciles, más baratas, más sensibles y accesibles) para evitar la propagación del virus y disminuir el número de casos no detectados (es decir, casos asintomáticos). Se ha realizado en este aspecto un gran esfuerzo desarrollando potenciales biosensores para COVID-19 que aumentan la sensibilidad (Ahmed *et al.* 2023; Patel *et al.* 2023; Rocha *et al.* 202; Silvestre *et al.* 2023; Tomichan *et al.* 2023) de los métodos ideados. Un dispositivo biosensor incluye un elemento de reconocimiento biomolecular para conferir selectividad (Asuero 2022; Ortega 2006) y un elemento de transducción de señales para permitir un análisis cuantitativo o semicuantitativo. La interacción entre las moléculas de analito y el elemento de biorreconocimiento (*e. g.*, una capa de moléculas de biorreceptor) en un receptor genérico provoca la transducción de un cambio físico-químico medible, como flujo de corriente, transferencia de calor, cambio de masa o índice de refracción, o propiedades mensurables más sofisticadas. Las señales capturadas se amplifican y procesan posteriormente de manera adecuada para proceder con el análisis de datos. Entre los biosensores más comunes se tienen los electroquímicos (Ahmed *et al.* 2023; Faham *et al.* 2023; Madhurantakam *et al.* 2022; Sundeep *et al.* 2023; Vasquez y Orosco 2023), los de transistor de efecto de campo (fig. 11) (Abrha *et al.* 2023; Liang *et al.* 2023; Mishra *et al.* 2023; Szunerits *et al.* 2023), de resonancia de plasmón de superficie localizada (LSPR) (Koushki *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023c; Yakoubi *et al.* 2023) y de dispersión Raman de superficie mejorada (SERS) (Qin *et al.* 2024; Wu 2023).

Los biosensores electroquímicos se han utilizado profusamente en la detección de ARN viral, proteínas, anticuerpos moleculares pequeños y partículas virales completas. La diana se puede reconocer usando una reacción antígeno-anticuerpo, hibridación de ARN, ADN o ácidos nucleicos peptídicos o aptámeros que se unen a la diana con alta afinidad y especificidad. La interacción biológica de estos procesos se traduce en señales eléctricas, midiendo luego propiedades electroquímicas como capacitancia, acumulación de carga, conductancia, corriente, impedancia o cambios de potencial. Los biosensores ópticos algunos de cuyos tipos se han indicado más arriba han sido objeto de tratamiento en revisiones recientes (John *et al.* 2023; Karki *et al.* 2024; Taha *et al.* 2024; Tessaro *et al.* 2023; Tomichan *et al.* 2024; Xu *et al.* 2022). Conviene resaltar el tremendo progreso logrado por la tecnología de laboratorio en un chip junto con los teléfonos inteligentes para mejorar las características de portabilidad y punto de atención de los biosensores ópticos.

Vamos a considerar unos cuantos ejemplos de biosensores con cierto detalle. Recientemente, Yu *et al.* (2023b) descubrieron y optimizaron varios ligandos peptídicos con afinidad por la proteína S del SARS-CoV-2 usando una tecnología combinatoria (OBOC, del inglés one-bead-one-compound) mediante detección colorimétrica ligada a enzimas. El péptido con mayor afinidad de unión, L10-2, se inmoviliza en la membrana nanofibrosa y microporosa, aprovechando su elevada superficie específica, proporcionando un biosensor muy sensible (ng/ml) y robusto. Además, se descubrió que el ligando utilizado detecta la proteína S derivada tanto de la cepa original como de la variante Delta en muestras de saliva.

Variados biosensores basados en nanopartículas (NP) permiten la detección del SARS-CoV-2 y virus relacionados (Singla *et al.* 2023). Las NP de oro y plata unidas a los anticuerpos, biomoléculas, proteínas y aptámeros también pueden aumentar las señales de LSPR y SERS y la transferencia de energía entre el fluoróforo y las NP de oro. En este caso, Lin *et al.* (2023a), desarrollaron una innovadora plataforma LFIA usando la espectroscopía SERS basada en fósforo negro bidimensional decorado con NP de Ag como importante unidad de captura de antígenos y amplificación de señales Raman para la detección de variantes del SARS-CoV-2 en 5-20 min.

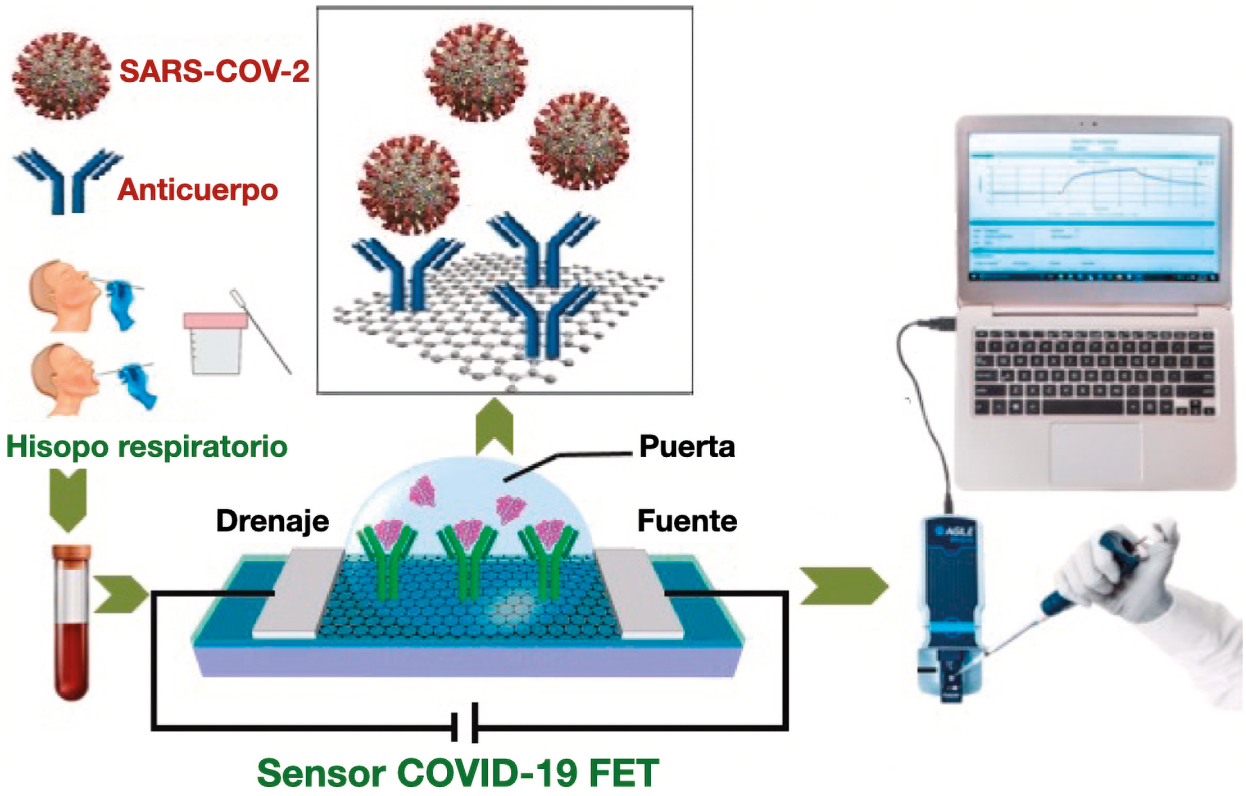


Figura 11. Representación esquemática de procedimiento operativo del sensor FET del SARS-CoV-2 (Seo *et al.* 2020; Lahrib *et al.* 2021). Fuente: American Chemical Society (ACS) y Ed. Elsevier

La nueva plataforma SERS-LFIA alcanza un límite de detección de 0,5 pg/ml y 100 copias/ml para la proteína N y el SARS-CoV-2, lo que demuestra una sensibilidad 1000 veces mayor que las tiras LFIA comerciales. En otro estudio, Aithal *et al.* (2022) utilizan nanosondas basadas en NP-Au funcionalizadas con un aptámero específico de la proteína S del SARS-CoV-2. Un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas confirma la unión del aptámero con la proteína S en la superficie del oro. El reconocimiento de proteínas se produce mediante la adición de un coagulante, donde las nanosondas sin proteínas unidas se aglomeran, mientras que aquellas con suficientes proteínas unidas no lo hacen. Utilizando espectros de absorbancia de plasmón, las nanosondas detectan concentraciones de 16 nM de la proteína S del SARS-CoV-2.

Nascimento *et al.* (2022) han desarrollado un magnetoensayo ultrasensible utilizando perlas magnéticas y NP-Au conjugadas con el péptido de la enzima conversiva de angiotensina 2 (ACE2) humana para la captura y detección de la proteína S del SARS-CoV-2 en saliva. La técnica aplicada requiere de un dispositivo electroquímico desechable que contiene ocho electrodos de carbono serigrafiados que permiten el análisis simultáneo de ocho muestras. El magnetoensayo mostró un límite de detección ultrabajo de 0,35 ag/ml en muestras de saliva.

Las propiedades espectrales distintivas y las interacciones biomoleculares características de la espectroscopia THz (Terahercios) despiertan una considerable atención. Los metamateriales pueden confinar el campo óptico en las proximidades de las celdas unitarias y mejorar la interacción entre la onda de THz y la molécula diana. Una tecnología THz de biodetección conjuga las propiedades de un metamaterial junto con nanopartículas magnéticas, lo que posibilita determinar con precisión (Bi *et al.* 2023) la proteína pico S del SARS-CoV-2. Un biosensor de fibra óptica se muestra asimismo capaz (Bae *et al.* 2024) de detectar la proteína espiga S del SARS-CoV-2 sin etiquetas y sin sensibilidad a la temperatura, con medición simultánea de la temperatura ambiente, utilizando una combinación de interferencia multimodo mediada por una fibra sin núcleo y la resonancia de fase coincidente generada por una rejilla de fibra de largo período.

En la fabricación de dispositivos POCT se utilizan principalmente elementos de biorreconocimiento que son costosos de producir y limitan la vida útil del sensor. Para superar estas limitaciones, los avances en la ciencia de los materiales han llevado al desarrollo de polímeros de impresión molecular (MIP) altamente selectivos. Los MIP han ganado recientemente una considerable atención en el diagnóstico del SARS-CoV-2 usando nanosensores electroquímicos (Singla *et al.* 2023; Singhal

et al. 2022). Por ejemplo, se ha desarrollado un sensor electroquímico portátil para detectar la nucleoproteína N del SARS-CoV-2.

El sensor se fabricó sobre un electrodo de película delgada a base de oro (Au-TFE). Un elemento clave del sensor es un chip sensor desechable (electrodo de película delgada) interconectado con una selectividad dotada de MIP para la nucleoproteína N y conectado con un potenciostato portátil. El sensor logra una excelente sensibilidad (LOD 15 fM) y en su aplicación fue capaz de señalar la presencia de la nucleoproteína N en muestras de hisopos nasofaríngeos de pacientes positivos por COVID-19 (Raziq *et al.* 2021). No obstante, esta tecnología se enfrenta todavía a algunos desafíos en aras de garantizar una fabricación y reproducibilidad confiables, lograr una unión selectiva en mezclas complicadas y mantener su rendimiento estable durante períodos de tiempo más largos (Singla *et al.* 2023).

A pesar de haberse producido un desarrollo espectacular en los últimos años, ninguno de los métodos vistos es totalmente ideal para el diagnóstico de la COVID-19, aunque se complementan entre sí de manera razonable. En general, las principales ventajas de los biosensores son la relación coste/beneficio, el tamaño reducido de la muestra, y la buena reproducibilidad, así como una detección rápida y una alta sensibilidad.

22. MARCOS ORGÁNICOS METÁLICOS (*METAL-ORGANIC FRAMEWORKS*)

El creciente avance en el campo de la química reticular, la química de sistemas formados por bloques de construcción moleculares regularmente interconectados para formar materiales en estado sólido, ha llevado al diseño de una gran cantidad de materiales para múltiples aplicaciones, incluidos materiales de detección (bio)químicos (Zuliani *et al.* 2023). Entre estos materiales, los marcos organometálicos (MOF, *metal-organic frameworks*) se encuentran en una fase de investigación más madura, incluyendo avances significativos en sensores basados en MOF. Las estructuras MOF son polímeros de coordinación compuestas por un centro metálico y un ligando orgánico. Se diseñan empleando iones metálicos biocompatibles (Fe^{+3}, Zn^{+2}, Mg^{+2}, Ca^{+2} y Mo^{+6}) y ligandos orgánicos bioactivos, permitiendo la modulación de la estructura y propiedades a escala nanométrica.

Las unidades de nodos metálicos, conectores orgánicos y motivos secuencialmente estructurales producen un número infinito de combinaciones posibles para formar un MOF (Zuliani *et al.* 2023). Actualmente se conocen más de 100.000 estructuras diferentes. Los MOF son ampliamente explorados en nanomedicina y biomedicina debido a sus excelentes propiedades, incluida una elevada área superficial, porosidad y variabilidad estructural, permitiendo sinergias de ingeniería entre nodos metálicos, conectores funcionales, sustratos o NP encapsuladas, catálisis heterogénea, intercambio iónico, administración controlada y dirigida de fármacos, etc. (Zuliani *et al.* 2023).

Todas estas características pueden (al menos teóricamente) abordar la necesidad de desarrollar nuevos materiales de detección con elevada sensibilidad y selectividad, tiempo de respuesta rápido, estabilidad mejorada y reutilización. Por ejemplo, mediante la exclusión del tamaño de moléculas más grandes, la combinación simultánea de la química de la superficie y las dimensiones de los poros se puede mejorar sinérgicamente la sensibilidad y la selectividad (Zuliani *et al.* 2023). Las plataformas de detección basadas en MOF han demostrado potencial para la detección viral específica. Las estructuras orgánicas covalentes (COF) son materiales orgánicos cristalinos porosos con estructuras bidimensionales o tridimensionales, que pueden emplearse para reducir la interacción entre la proteína de pico del SARS-CoV-2 y la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), además de otros efectos inhibidores. Estos materiales también se pueden aplicar para encapsular antibióticos o agentes antivirales contra patógenos. También se han estudiado para la inactivación fotodinámica de bacterias patógenas (Nematollahi *et al.* 2023).

A continuación, se describe con más detalle algunos estudios que utilizan biosensores basados en MOFs para la detección y diagnóstico del SARS-CoV-2, así como otros que utilizan los MOFs para el tratamiento y prevención de la COVID-19. Recientemente, Palanisamy *et al.* (2023) han propuesto la utilización de un chip biosensor que trabaja en tiempo real y basa la detección del SARS-CoV-2 en una señal electroquímica generada por nanohíbridos MOFs. En concreto, estos nanocompuestos están formados por derivados de la síntesis hidrotermal del CoFeBDCNH_2-$CoFe_2O_4$. Esta propuesta ha mejorado la sensibilidad de la detección de la glicoproteína espiga (proteína S) del SARS-CoV-2 y del pseudovirus SARS-CoV-2 en un solo paso. Así, los resultados presentan unos límites de detección para la proteína S de 6,68 fg/mL en disoluciones tampón y de 6,20 fg/mL en disoluciones con 10% de suero. Además, el estudio demuestra la capacidad de estos biosensores en la detección de la proteína S del SARS-CoV-2 en presencia de Ómicron BA.2 y pseudovirus de tipo salvaje D614G. Otros estudios sugieren utilizar nanosondas MOFs para detectar por fluorescencia la proteína espiga del SARS-CoV-2.

En el estudio llevado a cabo por Liu *et al.* (2023) se utiliza una nanosonda MOFs basada en la detección por fluorescencia, con estas sondas se obtuvieron límites de detección para la proteína S de 7,8 fg/mL. Además,

se demostró la elevada especificidad de la técnica. Otros autores publican estudios similares (Rabiee 2022; Yodsin 2022; Gona 2022; Zhao 2023; Hadynski 2023). En esta misma línea, y más recientemente, Wang *et al.* (2024) sugieren la utilización de los MOFs para mejorar el rendimiento de sensores que basan la detección en la electroquimioluminiscencia (ECL). Así, ellos proponen la síntesis de un nuevo sensor luminiscente denominado Zr-TCPP/NH_2-BDC (TCPP@UiO-66-NH_2) sintetizado mediante autoensamblaje de meso-tetra (4-carboxifenil) porfina (TCPP) con, uno de los MOFs más clásicos, el Zr-NH_2-BDC. El TCPP@UiO-66-NH_2 permite atrapar eficazmente al TCPP evitando así su efecto tóxico y presenta una señal electroquimioluminiscente muy intensa y estable.

Para mejorar aún más la sensibilidad del sensor, utilizan dióxido de manganeso recubierto de polidopamina (PDA@MnO_2), que tiene un doble efecto de amortiguación de la fluorescencia. En base a esta estructura, Wang *et al.* construyeron un sensor ECL de tipo quenching para la detección ultrasensible de la proteína N del SARS-CoV-2. El sensor creado presenta unos límites de detección de 1,4 fg/mL, permitiendo identificar y diagnosticar precozmente la infección vírica.

No obstante, las características de los MOFs los convierte no solo en una herramienta ultrasensible y selectiva para la detección del SARS-CoV-2 sino también en una herramienta útil y selectiva para inhibir la acción del virus interactuando con la proteína espiga o con la proteína M del SARS-CoV-2. Además, también se presenta como un buen vehículo para introducir moléculas biológicas como anticuerpos o nanocuerpos o fármacos virales. Así, Dahri *et al.* (2022) investigan la utilización de diferentes MOFs creados virtualmente (ZIF, UIO, and IR-MOF) en la inhibición de la unión de la proteína S al receptor, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE 2). Los resultados revelaron que el MOF ZIF es el mejor candidato para este objetivo por presentar menos interferencias con la proteína S que el resto de los ensayados.

Otro estudio llevado a cabo por Jodłowski *et al.* (2022) utilizan los MOFs basados en circonio combinados con la acriflavina (ACF) para crear un fármaco eficaz contra el SARS-CoV-2. Los resultados mostraron que la acriflavina inhibe la interacción entre la proteína S del virus y el receptor (ACE 2). Los resultados de citotoxicidad y ecotoxicidad confirmaron que los compuestos ACF@MOF pueden considerarse potencialmente seguros para los organismos vivos. Además, los resultados han corroborado que los compuestos ACF@MOF pueden considerarse candidatos potenciales para el tratamiento de la COVID-19. En otro estudio llevado a cabo por Desai y colaboradores en 2023 se explora la aplicabilidad de los MOFs como herramienta para desactivar las partículas de coronavirus mediante su inmovilización en la superficie de estos metales, actuando, así, como escudo contra la transmisión del SARS-CoV-2.

Aprovechando el alto contenido en poros de los MOFs en este estudio se han testado tres MOFs diferentes: UiO-66(Zr), UiO-66-NH2(Zr) y UiO-66-NO2(Zr), sobre los que se han funcionalizado agentes antivirales como ácido fólico, nistatina y tenofovir, que interaccionan de manera específica con la proteína S del virus. Se ha demostrado que los poros de los MOFs funcionalizados en superficie pueden adsorber agua, lo que los hace adecuados para deshidratar localmente aerosoles microbianos. Este estudio pone de relieve el inmenso potencial de los MOFs para desactivar coronavirus respiratorios antes de que lleguen al receptor.

Sin embargo, uno de los aspectos cruciales en las aplicaciones clínicas y biomédicas de los nanomateriales son las evaluaciones toxicológicas. Los nanomateriales pueden causar efectos nocivos o tóxicos para la salud humana (Zhang *et al.* 2021). Por ejemplo, un efecto toxicológico frecuente se encuentra en la respuesta al estrés oxidativo resultante en la generación de ROS. Además, pueden inducir impactos fisiopatológicos, como inflamación, fibrosis y genotoxicidad (Manke *et al.* 2013). Actualmente, para garantizar la eficacia y seguridad, se lleva a cabo un riguroso proceso de aprobación regulatoria en términos de su uso en nanoterapias para COVID-19 (Poustforoosh *et al.* 2021). Entre los más de 70.000 MOF depositados, solo unos pocos se han comercializado (Nematollahi *et al.* 2023). Por otro lado, aunque existen algunos MOF/COF solubles en agua (Zhang *et al.* 2020), la mayoría de ellos son insolubles en agua y para hacerlos solubles se necesitan modificaciones adicionales. Su escasa solubilidad en agua es otro de los grandes obstáculos para la comercialización.

El Premio Nobel de Química 2025 ha sido otorgado a los profesores Richard Robson, Susumu Kitagawa y Omar M Yaghi por su trabajo sobre sólidos porosos del tipo «estructuras metal-orgánicas» (MOFs).

23. TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

La COVID-19 también se puede confirmar mediante TC de pacientes sospechosos siendo su sensibilidad en el diagnóstico precoz una de las principales ventajas. Sin embargo, las imágenes de TC se limitan a los hospitales centrales más grandes. Por lo tanto, la aplicación de técnicas de imágenes radiológicas junto con la inteligencia artificial (IA) avanzada está emergiendo como una herramienta útil para el diagnóstico automático de COVID-19 mediante el uso de modificaciones en el patrón de imágenes que no son fácilmente identificables a simple vista (Akinyelu y Bah 2023; Chatterjee *et al.* 2021; Das *et al.* 2023b; Liu *et al.* 2022; Marefat *et al.* 2023, Subramaniam

et al. 2023; Zhou *et al.* 2023b). Los profesores Civit y Domínguez Morales de la Universidad de Sevilla han editado un número especial de Applied Sciences.

El uso de imágenes torácicas desempeña un papel importante en el diagnóstico, la predicción y el tratamiento de pacientes con síntomas de moderados a graves (Liu *et al.* 2022) de la COVID-19 o con evidencia de empeoramiento del estado respiratorio. Los modelos y herramientas de aprendizaje profundo satisfacen la urgente necesidad de gestionar e interpretar grandes cantidades de datos de imágenes de la COVID-19. En la mejora del diagnóstico rápido y preciso de la COVID-19, se utilizan comúnmente análisis de imágenes toráxicas de rayos X (CXR). La identificación de la infección manualmente mediante el análisis de imágenes radiológicas es dificultosa dado el tiempo empleado y el elevado riesgo de error humano (Subramaniam *et al.* 2023). Las técnicas emergentes de inteligencia artificial (IA) y redes neuronales convolucionales (Convolutional Neural Networks, CNN) van ganando posiciones entre los enfoques dirigidos a la clasificación de la COVID-19. Los modelos existentes de aprendizaje automático (Machine Learning, ML) o aprendizaje profundo (Deep Learning, DL) utilizados para la detección de la COVID-19, solos o en conjunto, ayudan a extraer características importantes y clasificar las afecciones de salud en pacientes de COVID-19, utilizando imágenes como CT-Scan, X-Ray, etc. Aunque se han logrado avances significativos con los modelos ML/DL, todavía existen limitaciones, *e. g.*, sobreajuste que conduce a predicciones incorrectas y a la sobrecarga de los modelos (Das *et al.* 2023b).

Cinco aspectos fundamentales del diagnóstico de imágenes de la COVID-19 basado en técnicas de aprendizaje profundo (Zhou *et al.* 2023b) han sido objeto de revisión: i) conjunto y mejora de datos; ii) métodos de segmentación de COVID-19 basados en aprendizaje supervisado; iii) aplicación al diagnóstico de imágenes semisupervisadas de COVID-19; iv) aplicación al diagnóstico de COVID-19 no supervisado, v) desafíos y futuras tendencias de los métodos de diagnóstico de imágenes de la COVID-19. Se ha ideado un método (Marefat *et al.* 2023) para detectar automáticamente COVID-19 a partir de imágenes de rayos X utilizando transformadores convolucionales compactos (CCT). Se ha propuesto para el diagnóstico de la COVID-19 el uso de una red neuronal de cápsulas (CapsNet). Las CapsNet son robustas frente a las rotaciones de imágenes y transformaciones afines, lo que resulta ventajoso al procesar conjuntos de datos de imágenes médicas. CapsNetCovid fue validada con dos conjuntos de datos de imágenes de tomografía computarizada e imágenes de rayos X de COVID-19 (Akinyelu y Bach 2023).

Se ha llevado a cabo el diagnóstico de enfermedades pulmonares relacionadas con el pos-COVID-19 a partir de imágenes de rayos X (Mezina y Burget 2023) con ayuda de una herramienta digital nueva, que utiliza el aprendizaje profundo, dedicada al análisis de los cambios pulmonares. La red neuronal (Vision Transformer) propuesta aplica al subgrupo de las 9 enfermedades del conjunto de rayos X y tórax que pueden aparecer como consecuencia de la COVID, la función de pérdida asimétrica (ASL, asymmetric loss function) modificada, para la clasificación de etiquetas múltiples, lográndose una mayor precisión que con las arquitecturas conocidas existentes.

24. PRUEBAS DE ANTICUERPOS

Controlar la fuente de infección y proteger a la población susceptible son dos medidas importantes para prevenir enfermedades infecciosas. La necesidad de plataformas POC (fig. 12) rápidas, transportables, de bajo costo, fáciles de usar, descentralizadas y de alta frecuencia para la identificación y el diagnóstico tempranos aumentó a medida que avanzaba la pandemia. De la misma forma, se evidenció el impacto de la transmisión asintomática, el talón de Aquiles (Peeling y Sia 2023) de la contención de la enfermedad. Por tanto, los pacientes podían aislarse o ponerse en cuarentena fácilmente. Las pruebas de anticuerpos (IgG, IgM e IgA...) son herramientas adecuadas para realizar un cribado extremo de la población y conocer la capacidad inmunitaria desarrollada tras un período de exposición al virus. También son cruciales para la identificación de infecciones asintomáticas a pesar de que no pueden proporcionar resultados confiables sobre el estado de la infección en el momento de la prueba.

Las pruebas con anticuerpos (Liu y Rusling 2021; Martin *et al.* 2021; Mohit *et al.* 2021; Peng *et al.* 2023a; Peng *et al.* 2023b) de unión que reconocen al antígeno se clasifican en dos categorías amplias, pruebas de laboratorio ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima) o CLIA (quimioluminiscentes) y pruebas POC (LFIA) (Inmunoensayo de flujo lateral). LFA, también conocida como prueba de tira o ensayo inmunocromatográfico (Budd *et al.* 2023; Lee *et al.* 2023; Lin *et al.* 2023a; Nan *et al.* 2023; Spicuzza *et al.* 2023; Sun *et al.* 2023; Yang *et al.* 2023a) posee las ventajas de patrones de uso simples, consumo de tiempo corto, buena estabilidad a largo plazo y bajo costo, por lo que es un método de detección de pruebas en el lugar de atención ampliamente utilizado.

Una estrategia que combina la selección de amplificación única con la selección sin amplificación desarrolla un fago (Pang *et al.* 2024) que presenta el heptapéptido cíclico ACLDWLFNSC (péptido J4) y muestra una buena afinidad y especificidad por la proteína de pico S del SARS-CoV-2. El acoplamiento molecular sugiere que el péptido J4 se une a la subunidad S2 mediante enlaces

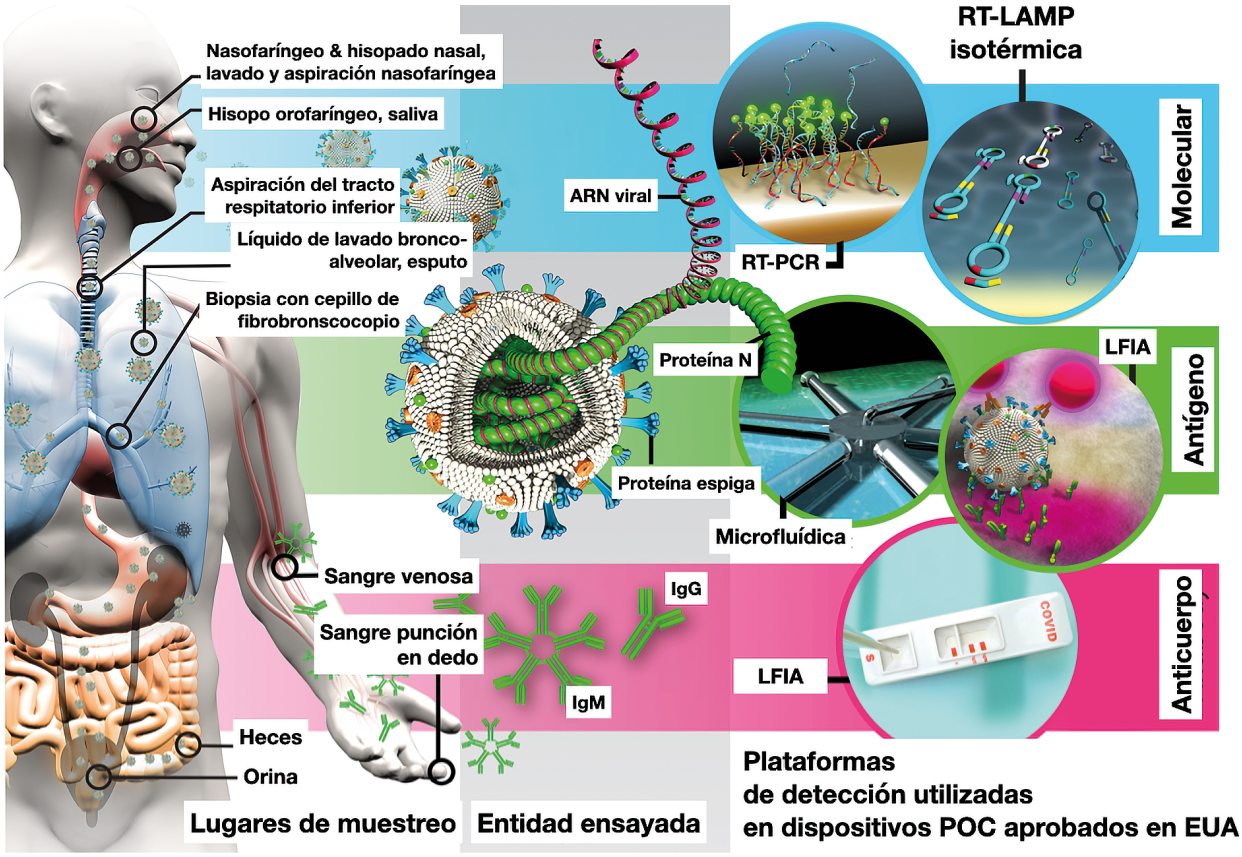


Figura 12. Plataformas de detección POC aprobadas según «Autorización para Uso de Emergencia» (Valera *et al.* 2021). Muestras humanas donde se puede encontrar el virus SARS-CoV-2. La fila azul conecta el ARN viral con la fuente de la muestra y las tecnologías de amplificación molecular. La fila verde conecta las proteínas virales con la fuente de la muestra y las tecnologías utilizadas para las pruebas de antígenos. La fila roja conecta los anticuerpos con las fuentes de sangre y las tecnologías utilizadas para las pruebas de anticuerpos. Fuente: American Chemical Society (ACS)

de hidrógeno e interacción hidrofóbica. El fago J4 se utiliza como anticuerpo de captura para establecer sistemas analíticos de inmunoensayo de quimioluminiscencia basado en fagos (CLIA) y espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). La plataforma de inmunoensayo de doble modo propuesta mostró buena sensibilidad y confiabilidad en el ensayo de pseudovirus y proteína S del SARS-CoV-2.

En general el LFA consta de una almohadilla en la que se carga la muestra que se va a analizar, una almohadilla que contiene la molécula de biorreconocimiento marcada para el objetivo, una membrana de nitrocelulosa (NC) que inmoviliza la molécula de captura y control, y de una almohadilla absorbente que proporciona la fuerza capilar. La solución de muestra se mueve por capilaridad a través de la membrana hacia la almohadilla absorbente, capturándose las moléculas de biorreconocimiento marcadas en la línea de prueba (T) tras unirse a los analitos diana, originando cambios de color significativos. Las pruebas LFIA son más fáciles de usar y proporcionan los resultados rápidamente (10 a 30 minutos), pero ofrecen solo información cualitativa y su precisión no siempre es suficiente. También se reportan resultados falsos negativos como consecuencia de la baja concentración de anticuerpos y la falta de sensibilidad. Las respuestas, no obstante, también se pueden convertir en señales de fluorescencia, Raman, quimioluminiscencia (CL) y magnéticas para lograr ensayos cualitativos y cuantitativos

Esta situación ha provocado una fuerte motivación para que los investigadores desarrollen potenciales biosensores, utilizándose a este respecto los basados en nanopartículas o nanoislas de oro y grafeno (Abrha *et al.* 2023; Rasmi *et al.* 2023; Szunerits *et al.* 2023). Las nanopartículas de oro se consideran el material ideal para la detección colorimétrica a simple vista. Se ha empleado software de reconocimiento de color con propósitos de cuantificación. La detección del patrón de emisión de fluorescencia es más sensible que la absorción de luz. Los puntos cuánticos son los principales materiales aplicados a la sensibilización de LFA fluorescentes y muestran una buena resolución. Moungi Gabriel Bawendi (1961-), químico estadounidense con nacionalidad tunecina y francesa, Louis Eugene Brus (1943-), químico estadounidense, y Alexei Ekimov (1945-), físico ruso

nacionalizado estadounidense han sido galardonados (Sanderson y Castelvecchi 2023) con el Premio Nobel de Química año 2023 por el descubrimiento de los puntos cuánticos, claves en materia de nanotecnología (Asuero *et al.* 2022).

Las nanoetiquetas SERS constan de un sustrato mejorado (nanopartículas de Au/Ag), moléculas de tinción RAMAN y anticuerpos específicos. Puede recurrirse también al cambio significativo de impedancia causado en la corriente alterna en un material magnético blando durante la aplicación de un campo magnético externo. Nanopartículas encapsuladas de sílice mesoporosa como etiquetas fluorescentes detectan cuantitativamente proteínas S y N del SARS-CoV-2 (Guo *et al.* 2021). Las nanopartículas de conversión ascendente (Upconversion nanoparticles, UCNPs) son un tipo de nanomaterial luminiscente dopado con tierras raras que puede convertir la excitación NIR en luz visible. Una mezcla de butanol y nanopartículas de oro y ADN diana crea un sustrato de dispersión Raman mejorado en superficie (SERS) reproducible y altamente sensible (Wu *et al.* 2003) que se evalúa mediante espectroscopía Raman utilizándose para detectar el SARS-CoV-2 con un límite de detección de 3,1 fM.

Nanopartículas de oro integradas en electrodos de carbono serigrafiados conteniendo la proteína «spike» recombinante del SARS-CoV-2 inmovilizada entrecruzada con glutaraldehído permiten (Baradoke *et al.* 2024) el reconocimiento selectivo de anticuerpos anti-S. Se ha descrito un inmunosensor electroquímico simple con detección voltamperométrica, desechable y ecológico, fabricado con esténcil utilizando materiales de bajo costo (Rocha *et al.* 2024) como láminas de poliéster, escamas de grafito y resina natural. Nanopartículas de oro estabilizadas con cisteamina, glutaraldehído, anticuerpo monoclonal de proteína S anti SARS-CoV-2 (Ab) como receptor biológico y albúmina sérica bovina como capa protectora. Se aplica a hisopos sin diluir de pacientes asintomáticos. Se ha puesto a punto un ensayo de extinción radiométrica de doble afinidad (Kilgour *et al.* 2023) para la cuantificación de anticuerpos anti SARS-CoV-2, *e. g.*, en saliva y plasma, adoptándose como analitos modelo anticuerpos monoclonales dirigidos a la nucleocápside del SARS-CoV-2 así como a la proteína de pico de las variantes Delta y Ómicron.

Los LFA se destinan principalmente a detectar información serológica contra la infección, proporcionando una prueba de fácil de uso y creciente aplicación en los entornos domésticos. Los recientes avances en la aplicación del LFA en modo sándwich para detectar genes, proteína N, proteína S y anticuerpos del SARS-CoV-2 han sido objeto de reciente revisión (Pei *et al.* 2023; Peng *et al.* 2023b).

25. SENSORES CORPORALES Y TELÉFONOS CELULARES

La transformación tecnológica ha cambiado muchos aspectos de nuestra vida. IoT / IoMT se utiliza en la detección de la COVID-19 a través de POC, incluida la integración de «blockchain» (cadena de bloques) (Kumar *et al.* 2023a; Qahtan *et al.* 2023; Rejeb *et al.* 2023) y la tecnología celular 5G de elevado ancho de banda. El 70 % de la población mundial usa dispositivos móviles, un 65 % de ellos teléfonos inteligentes, y unos 4 mil millones de personas están activas en las plataformas de redes sociales. La integración de la nanotecnología con sensores portátiles (personales) y teléfonos inteligentes (Ceballa-Koukoula *et al.* 2023; Ehtesabi y Azfalpour 2023; Galetsi *et al.* 2023; Lin y Chang 2023; Namirad *et al.* 2023; Ross *et al.* 2023; Zayed *et al.* 2023) constituye un reto, facilitando el diagnóstico con la ayuda de biosensores inteligentes. Sin embargo, son necesarios un mayor número de estudios con objeto de comparar los métodos recientemente desarrollados en términos de sensibilidad, reproducibilidad, y fiabilidad. La validación precisa de las características de desempeño de los métodos es de suma importancia cuando está en juego la salud humana. (Guo *et al.* 2021; Li *et al.* 2021; Qahtan *et al.* 2023; Xie *et al.* 2023; Yang *et al.* 2022; Zovko *et al.* 2023).

El avance de los sensores portátiles de telemedicina delinea los tres niveles interconectados para el monitoreo inteligente de la atención médica. El Nivel 1 genera pequeños sensores inalámbricos inteligentes para recopilar señales físicas de los pacientes y transmitir esta información al Nivel 2 a través de redes inalámbricas de área corporal (Wireless body area network, WBAN), y los datos de monitoreo se transfieren a través de una puerta de enlace personal (por ejemplo, teléfonos inteligentes, computadoras) mediante protocolos de red (*e. g. bluetooth*, *zigbee*, *wifi*). Existe un desarrollo prometedor y optimizado de nuevos materiales activos para detectar mecanismos humanos profundos beneficiosos para los avances de la telemedicina.

Los dispositivos portátiles (biosensores, rastreadores de actividad, pulseras, cascos y relojes inteligentes), requieren fuentes de energía adecuadas (biomecánica, bioquímica, solar) y pueden revolucionar (Bardhan *et al.* 2023; Devi *et al.* 2023; Gsangaya *et al.* 2022; Kalasin *et al.* 2023; Ghorbanizamani *et al.* 2023; Mao *et al.* 2023; Min *et al.* 2023; Poongodi *et al.* 2022; Ray *et al.* 2019; Song *et al.* 2021b; Zhao *et al.* 2022a) la asistencia sanitaria personalizada y la telemedicina. Disponen de un acceso continuo en forma no invasiva (Han *et al.* 2021b) a datos fisiológicos (biofísicos y bioquímicos) claves (temperatura, signos vitales, cuerpo movimiento y biomarcadores moleculares) en tiempo real. Proporcionan

información única y precisa sobre nuestra salud y bienestar, facilitando el diagnóstico y la supervisión de la enfermedad. Los cambios sutiles en los datos continuos recopilados por sensores personales pueden detectar una infección por COVID-19 (Quer *et al.* 2021), de forma temprana tanto en casos (Ates *et al.* 2021) asintomáticos como presintomáticos. El análisis de las señales de los relojes inteligentes mediante un algoritmo de detección en línea proporciona (Alavi *et al.* 2022) una advertencia anticipada de la infección por SARS-CoV-2 en un alto porcentaje de casos.

El uso de sensores portátiles emergentes de bajo costo (tatuajes epidérmicos, lentes de contacto, textiles, mascarillas, muñequeras y parches) amplía y mejora el campo de acción, al obtener muestras físicas y señales bioquímicas antes inaccesibles. La inclusión de diferentes transductores (es decir, dispositivos multimodales) o la evaluación simultánea de analitos de forma multiplexada amplían su funcionalidad. El desarrollo de tales soluciones para prevenir COVID-19, requiere contribuciones procedentes de una amplia gama de campos (biología, electrónica, informática, etc.). En adición, los sistemas electrónicos implantes (Chug *et al.* 2023; Ghorbaniza-nami *et al.* 2023; Kim *et al.* 2023; Li *et al.* 2021; Shi *et al.* 2029) autoalimentados e integrados en el cuerpo, permiten un seguimiento preciso y a largo plazo de señales lógicas de la piel y órganos internos. El alto costo de producción y mantenimiento, limitación de uso y lugares de implantación restringen el desarrollo y comercialización de estos dispositivos.

Los multisensores pueden cubrir diversos parámetros fisiológicos y de rastreo de contactos (Channa *et al.* 2021), creando bases de datos digitales y brindando acceso a los médicos, utilizando servicios en la nube. Tener varios dispositivos portátiles, uno para cada función o flujo de datos, haría que el individuo pareciera un cíborg disuadiéndole de su empleo incluso si los datos se administran de manera efectiva. Los desafíos relacionados con las compensaciones de diseño, los sensores mejorados, la potencia, el tamaño, los algoritmos de cálculo y la seguridad deben resolverse lo antes posible para hacer realidad la utilidad clínica de estos dispositivos portátiles.

26. CRISP

La proteína asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISP/Cas) es una herramienta atractiva de detección de genes y cuando se combina con métodos de amplificación de ácidos nucleicos se ha empleado en el diagnóstico genético (tabla 2) (Martin *et al.* 2021; Pei *et al.* 2023; Salgado-Fernández 2022). El sistema CRISP básico costa de dos elementos, una proteína nucleasa (función) que corta ADN y un ARN guía (especificidad) que posiciona a la enzima hacia el lugar del genoma sobre el que debe actuar La detección de ácidos nucleicos basada en CRISP (fig. 13) muestra un gran potencial en el desarrollo de enfoques de diagnóstico molecular de próxima generación como técnicas específicas, sensibles y confiables que pueden establecerse y aplicarse al diagnóstico de la COVID-19 (Ghouneimy *et al.* 2023; Li *et al.* 2023; Nafian *et al.* 2023; Najafabady *et al.* 2023; Sohail *et al.* 2022; Tian *et al.* 2023; Xiao *et al.* 2023; Yang *et al.* 2023c).

Emmanuelle Charpentier (1968-), microbióloga y bioquímica francesa, y Jennifer Anne Doudna (1964-), bioquímica estadounidense, recibieron el Premio Nobel de Química 2020 por la puesta a punto de esta técnica (Cossart 2021). Charpentier realizó su Tesis Doctoral sobre resistencia de los antibióticos en el Instituto Pasteur (Paris) bajo la dirección de Patrice Courvalin (1944-). Doudna fue alumna de doctorado de Jack Szostak en la Universidad de Harvard. El futuro de la detección por cribado de COVID-19 es la detección eléctrica de ácidos nucleicos

Tabla 2. Ensayos basados en CRISP usados en la detección del SARS-CoV-2

	Amplificación	Cas	Detección	Diana viral
SHERLOCK	RT-RPA	Cas13a	Fluorescencia, flujo lateral	S, N, gen Orf1a,b
DETECTR	RT-LAMP	Cas12a	Flujo lateral	Genes N y E
AIOD-CRISPR	RT-RPA	Cas12a	UV o LED	Gen N
ENHANCE	RT-LAMP	Cas12a	UV o LED	Gen N
CASdetec	RT-RAA	Cas12b	Basada en papel	Gen RdRp
FELUDA	RT-RPA	Cas9a	Basada en papel	Nsp8 y gen N

Acrónimos: SHERLOCK: Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unLOCking; DETECTR: DNA Endonuclease Targeted CRISP Trans Reporter; AIOD-CRISP: All-inOne Dual CRISPR; CASdetec: CRISP-Cas12b-mediated DNA detection; ENHANCE: Enhanced analysis of nucleic acids with crRNA (CRISP RNA) extensions; FELUDA: FNCAS9 Editor-Linked Uniform Detection Assay

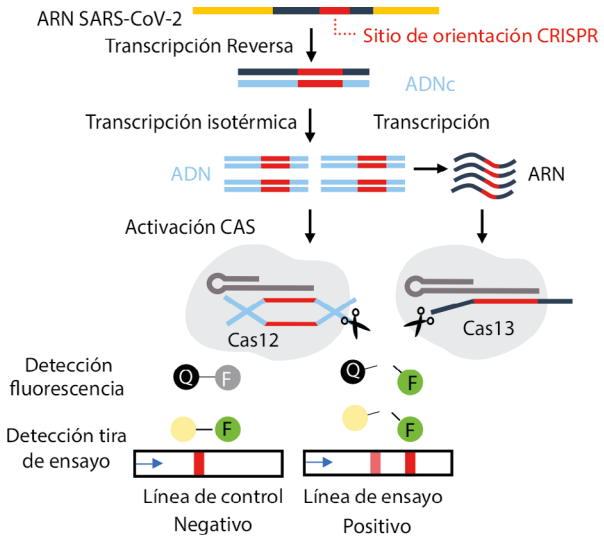


Figura 13. Esquema de la amplificación isotérmica incorporando tecnología CRISP de detección de SARS-Cov-2 (Feng *et al.* 2020). Fuente: American Chemical Society (ACS)

sobre la base de plataformas basadas en CRISPR-Cas de laboratorio en chip, dados los niveles de fM alcanzados en su detección.

27. ESFUERZOS MULTIDISCIPLINARES

La COVID-19 demostró que el aumento del número de pacientes, la carencia de servicios médicos, la falta de prevención de infecciones y una respuesta tardía (Ahad y Tahir 2023) provocaron el colapso de los sistemas de salud incluso en las naciones más desarrolladas del mundo. Las personas se sentían frustradas, preocupadas y estresadas, no solo por los impactos inmediatos del virus en la salud (Mandl *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023), sino también por la falta de comunicación social causada por las restricciones del movimiento. Durante los momentos más álgidos de la pandemia causada por el SARS-CoV-2 incluso se advirtieron situaciones discriminatorias (Súarez-Vergne y Tardivo 2023) hacia algunos colectivos como pacientes y expacientes de COVID-19, personas de origen asiático y personal sanitario. Un testimonio del extraordinario progreso en la terapia clínica es el desarrollo de vacunas altamente eficaces que han desempeñado un papel fundamental (Liu *et al.* 2023a) en la atenuación de la gravedad de la enfermedad y en la preservación de innumerables vidas. El desarrollo de vacunas que sean más estables a temperatura ambiente o de refrigerador redundará (Couvreur 2023) en su mejor almacenamiento y facilitará la vacunación en las consultas médicas o farmacias comunitarias.

La COVID-19 ha sacudido los estándares establecidos por la economía digital y ha impulsado nuevas ideas sobre posibles estructuras con cambios aparejados en la ética y normas sociales, estimulando una rápida evolución (Abbas *et al.* 2023) de diversos servicios cognitivos, digitales y basados en INTERNET. La COVID-19 ha fomentado una mayor aceptación de la tecnología sin contacto (Bauer 2023) relativa a todo lo relacionado con los viajes. Las expectativas personales con respecto a la higiene, la salud y la seguridad y el riesgo de infección también han cambiado y van a mantenerse. Las emergencias reafirman la importancia del progreso técnico (Abbas *et al.* 2023) y la oportunidad de mejorar el diseño y la productividad. Las farmacias comunitarias han cambiado durante la pandemia de la COVID-19 y se han introducido nuevas pautas (Persson *et al.* 2023) para abordar las necesidades de los pacientes y el personal y reducir el riesgo de propagación de la infección.

La pandemia ha demostrado (Cox *et al.* 2023; Moradian *et al.* 2020; Peeling y Sia 2023) que la preocupación por la salud pública no es solo un problema médico, sino que afecta a la sociedad en su conjunto; convirtiéndose en la principal preocupación científica. «Our normal daily things lost their importance» comenta Roser Valenti, físico teórico de la Universidad Goethe de Frankfurt en Alemania (Gibney 2020). «We thought: can we do something to contribute to understanding what's going on?» El abordaje de próximas emergencias sanitarias (ECDT 2023; Hodson 2022; Ministerio de Sanidad 2023) se ha convertido en un foco de atención para muchos gobiernos en todo el mundo, a la espera de una nueva eventualidad. De hecho, es probable que determinadas circunstancias (Couvreur 2023; Piaggio *et al.* 2023), como la globalización y el incremento de la movilidad, la intensificación de la agricultura y el cambio consiguiente en los usos del suelo, el aumento del contacto con la vida silvestre, la creciente urbanización, la crisis climática y el calentamiento global, el aumento de la población mundial y la extraordinaria capacidad de adaptación de los virus conduzcan a nuevas pandemias, debido al mayor riesgo de zoonosis.

A pesar de la disponibilidad ampliamente extendida de vacunas, resulta necesaria incidir en la importancia de las pruebas (da Silva *et al.* 2022) para monitorear la evolución del virus y las etapas resultantes de la pandemia. Es por lo que resulta imperativo (Alafeef y Pan 2022) desarrollar métodos de detección y técnicas de diagnóstico que sirvan como primera línea de defensa. Iniciar ambiciosos programas de descubrimiento de fármacos (Couvreur 2023) también debe formar parte de la estrategia para anticipar futuras pandemias.

El ejemplo de estas tecnologías de detección puede abarcar desde sensores portátiles y sensores de punto de atención hasta sensores implantables (Chug *et al.* 2023; Ghorbanizamani *et al.* 2023; Han *et al.* 2021; Kim *et al.* 2023; Li *et al.* 2021). Los biosensores basados en

nanotecnología exhiben una alta sensibilidad, lo que permite la detección personalizada. El uso de la nanotecnología en el diseño y fabricación de sensores aborda desafíos actuales en el campo del diagnóstico en términos de estabilidad, producción en masa, sensibilidad y capacidad multiplexora. Los químicos analíticos debemos aunar esfuerzos (Martin *et al.* 2021) para contribuir también, junto con otros colegas científicos multidisciplinares (Erdem 2022; Feng *et al.* 2020; Martin *et al.* 2021), clínicos, profesionales de la salud (médicos, farmacéuticos, veterinarios, biólogos), ingenieros, a la solución de los problemas derivados de la COVID-19 y futuras pandemias, ayudando a prevenir numerosas muertes y desastres económicos y a mitigar las consecuencias sociales resultantes.

La Hydra (de Lerna), el monstruo de la mitología griega, con un anillo de cabezas con flores para volver a crecer, descrito por Hesíodo en su Teogonía ha venido (Popovic *et al.* 2023) a perseguirnos, en forma de virus, en el siglo XXI. El SARS-CoV-2 tiene múltiples variantes y cada una de ellas trae consigo una nueva ola pandémica, y cada vez que se suprime una, otra o más variantes parecen ocupar su lugar. El 4 de julio de 2023 se declaró oficialmente la finalización (BOE 2023) de la crisis sanitaria en España. Una de las principales lecciones aprendidas de la COVID-19 ha sido la extrema urgencia de prepararse mejor (Busse *et al.* 2022; da Silva *et al.* 2022; Davis 2021; Hodson 2022; Inglet 2022; Ginneken 2022; Parlamento Europeo 2023; Peeling y Sia 2023; Report 2023; Safaati *et al.* 2023; Stenseth *et al.* 2021; Valipour *et al.* 2023) para futuras pandemias. Las medidas de prevención y contención se consideran prioridades máximas tanto por parte de los líderes políticos como de los científicos, ya que las graves repercusiones y consecuencias derivadas (Klein 2023; Niggs *et al.* 2023) sobre los individuos, la economía y la salud son duraderas. Existen oportunidades para abordar estos desafíos garantizando el acceso a los recursos y creando redes de contactos (Escadafal *et al.* 2023) que comparten protocolos armónicos prestos a activarse y ponerse en marcha rápidamente en situaciones de emergencia. Es primordial la adopción de un enfoque integrado e interdisciplinario (Nii-Trebi *et al.* 2023) que involucre a todas las partes interesadas en el gobierno, salud pública, investigación, entorno académico y empresas fabricantes de medicamentos, para ayudar en el control y la prevención de los brotes de enfermedades virales.

Disciplinas de múltiples saberes abarcan perspectivas de investigación (Moradian *et al.* 2020) conducentes a la observación, análisis, comprensión e interpretación de las consecuencias para la salud de la COVID-19. Aunar los esfuerzos requiere la comprensión de conceptos interdisciplinarios (Nii-Trebi *et al.* 2023; Sach *et al.* 2022; Tyagi *et al.* 2020), y el conocimiento de los problemas planteados. La recomendación más básica que se formula a la luz del informe de la Comisión Lancet sobre lecciones futuras de la pandemia de la COVID-19 es el fortalecimiento (Sach *et al.* 2022) del multilateralismo en todas sus dimensiones cruciales, públicas, culturales, institucionales, y financieras. El ideal de coexistir en la diferencia (Mol y Hardon 2020) conduce a tipos creativos y generativos de interdisciplinariedad. Hay que resaltar el papel relevante desempeñado en el conocimiento y la gestión eficaz de la COVID-19, por organismos relacionados con la Salud (OMS, FAO), así como ONGs, consorcios como USERN (Red Universal de Investigación y Educación Científica) y las Academias científicas de ámbito nacional e internacional. La gestión de la pandemia necesita no solo atender a los ciudadanos no expertos o a los actores no humanos, sino también atender a la puesta en escena de nuevas realidades, tiempos y espacios (Baleriola *et al.* 2023): cosmopolítica y cosmoética.

El año 2016 se propuso en Japón, en el marco del quinto plan básico gubernamental de ciencia y tecnología (Bida *et al.* 2023), el concepto de Sociedad 5.0, una sociedad futura, mejorada por el uso de las nuevas tecnologías, *e. g.*, la inteligencia artificial (IA), la computación en la nube y el Internet de las cosas (IoT). Se trata de alcanzar en último término los objetivos contemplados en la Agenda 2030 para el desarrollo sostenible, aprobado en 2015 por las Naciones Unidas (ONU). La integración de sistemas ciberfísicos y el almacenamiento y gestión responsable de los datos (Woodward *et al.* 2022) con la tecnología de cadenas en bloque, de enfermedades infecciosas, supondrá un cambio revolucionario en el ecosistema sanitario, contribuyendo con el análisis y la gestión de los datos emergentes a las tareas de vigilancia y a la toma de decisiones (MacIntyre *et al.* 2022; Shausan *et al.* 2023). No obstante, será necesario diseñar, idear y gestionar redes y fuentes de energías novedosas e inteligentes y resolver cuestiones legales, y éticas consiguientes, así como vencer algunas reticencias, con la finalidad de lograr habitar en una sociedad pospandémica (Woodward *et al.* 2022) más sostenible.

COMENTARIOS FINALES

Una línea importante de la investigación viral se orienta hacia los métodos biológicos y biomédicos moleculares. El SARS-CoV-2 también puede detectarse mediante las pruebas de antígeno (Chen *et al.* 2023c; Chug y Skevaky 2023) que han sido autorizadas para determinar si el paciente está infectado en el momento del análisis. Aunque estas pruebas son menos sensibles que la RT-PCR, son más rápidas y se pueden realizar (Le 2021; Peng *et al.* 2023b) sin necesidad de instrumentos específicos.

El diagnóstico del SARS-CoV-2 en una etapa temprana identifica a las personas infectadas por el SARS-CoV-2, lo que favorece el control de la propagación y previene el resurgimiento de la COVID-19. La disponibilidad limitada de pruebas rápidas para detectar la COVID-19 fue el principal obstáculo para contener la propagación del virus (Alafeef y Pau 2022). En este aspecto, la detección de LFA desempeña (Pei *et al.* 2023; Sun *et al.* 2023) un papel crucial a la hora de apuntar a biomarcadores específicos del SARS-CoV-2, *e. g.* genes, proteína N, proteína S y anticuerpos. Los últimos avances en este tipo de pruebas han mejorado (Gupta *et al.* 2023) la sensibilidad de los resultados. Los nanomateriales han constituido un elemento decisivo en el desarrollo de kits de diagnóstico de la enfermedad, así como un factor clave (Alafeev y Pan 2022; Lozano *et al.* 2023; Perveen *et al.* 2023; Yari *et al.* 2023) para mejorar el rendimiento de las pruebas existentes.

Las pruebas de anticuerpos pueden identificar a las personas con una fuerte respuesta de anticuerpos neutralizantes que podrían ser donantes adecuados (Chen *et al.* 2023c; Esmail *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2023a) para la terapia de plasma o suero de convalecencia en el tratamiento de aquellos con síntomas graves. Las pruebas multiplex se han vuelto cada vez más solicitadas en los diagnósticos clínicos contemporáneos. Con el creciente número de (bio) marcadores descubiertos, a menudo existe la necesidad de detectar varios (bio) marcadores simultáneamente para generar información significativa o concluyente.

La necesidad de herramientas que faciliten la detección rápida y el monitoreo continuo de las variantes preocupantes (VOC) del SARS-CoV-2 nunca ha sido tan grande, ya que estas variantes (Bechtold *et al.* 2021) son más transmisibles y, por lo tanto, aumentan la presión de la COVID-19 sobre los sistemas de salud. La pandemia de COVID-19 ha ido acompañada de la evolución del SARS-CoV-2 y la aparición de variantes virales que han superado con creces las expectativas iniciales (Chen 2023b; Hillari *et al.* 2023; Islam 2024; Jacobs *et al.* 2023; Polatoglu *et al.* 2023), cada una con sustituciones de aminoácidos únicas y superpuestas que han afectado la transmisibilidad, la gravedad de la enfermedad y la susceptibilidad a respuestas inmunes naturales o inducidas por vacunas y anticuerpos monoclonales. El seguimiento de las variantes existentes y la vigilancia de las nuevas es fundamental para conseguir una respuesta eficaz en la lucha contra la enfermedad.

Motivado por el éxito de la revolución 4.0 (Industry 4.0) se desarrolla Salud 4.0 (Health 4.0) que se centra en el paciente e integra servicios como computación en la nube/niebla (Cloud/Fog Computing), datos masivos (Big Data), red 5G, red 6 G, cadena de bloques (Blockchain) e Internet de las cosas (IoT) (Loeza-Mejía *et al.* 2021; Lin y Chang 2023). La asistencia sanitaria es uno de los sectores destacados beneficiados por el avance de IoT (Aski 2023; Dwivedi *et al.* 2022; Inuwa *et al.* 2022). La continua reducción en el precio de la electrónica de silicio de baja potencia y el aumento en la potencia computacional, la descentralización en el proceso de datos y la conectividad de las redes inalámbrica con los agentes de atención médica acelera el proceso de la toma de decisiones.

En los últimos años, con el auge experimentado por la microelectrónica y comunicaciones (Peeling y Sia 2023) se han producido rápidos avances en el campo de los biosensores para la salud móvil personal integrando avances en ciencia de materiales e instrumentación que permiten recopilar y analizar datos de salud en entornos descentralizados. La integración de biosensores en dispositivo de salud móviles basados en teléfonos inteligentes ha permitido (Peeling y Sia 2003) la monitorización de los signos vitales, la presión arterial y la saturación de oxígeno. Los inmunoensayos enzimáticos en el punto de atención pueden funcionar con teléfonos inteligentes mediante el uso de un pequeño dispositivo de diagnóstico portátil adicional. La integración de estos materiales novedosos, incluidos dispositivos implantables con funcionalidades especiales, permite el rápido desarrollo de plataformas de detección en el punto de atención (POC), reemplazando a los procedimientos médicos convencionales (Chug *et al.* 2023; Ghorbanizamani *et al.* 2023; Kim *et al.* 2023; Li *et al.* 2021; Shi 2019; Shi *et al.* 2022). Las nanotecnologías de detección que hacen uso de propiedades ópticas, plasmónicas y eléctricas únicas abarcan desde sensores portátiles y sensores de punto de atención hasta sensores implantables. Los sensores portátiles pueden cambiar las reglas del juego, ya que poseen el potencial de revolucionar el sector de la salud empoderando (Kalasin y Surareungchai 2023) a las personas y sistemas de salud para lograr resultados individualizados.

La inteligencia artificial (IA) y la tecnología móvil ofrecen herramientas de recopilación de datos, a un coste reducido, que facilitan el rastreo de contactos, la verificación de síntomas, la predicción de epidemias y vulnerabilidades, y un diagnóstico más rápido de la enfermedad (Ali *et al.* 2023; Sood *et al.* 2022; Yadav *et al.* 2021). Todo esto plantea problemas relacionados con la seguridad de los datos, el cifrado, la ética y la regulación adecuada (Galetsi *et al.* 2023; Kamalov *et al.* 2023; Qahtan *et al.* 2023; Rao y Deebak 2023; Thapa *et al.* 2023). Las máscaras faciales con sensores integrados pueden ofrecer acceso directo a importantes parámetros (patrones y tasas de respiración, biomarcadores de inflamación, detección de patógenos en el aire). Algunos usos (rastreo de contactos, detección de temperatura...) de la IoT se

relacionan directamente (Yousif *et al.* 2021) con la mitigación de la propagación del virus, mientras que otros apuntan a la nueva realidad motivada por la pandemia de la COVID-19 (trabajo en casa o teletrabajo, educación en el hogar, acondicionamiento físico del hogar).

La capacidad de realizar diagnósticos y monitoreo de la COVID-19 a partir de una amplia variedad de muestras con una eficiencia similar y un procesamiento mínimo pone a prueba el futuro de los dispositivos analíticos y bioanalíticos basados en teléfonos inteligentes (Ehtesabai y Afzalpour 2023; Galetsi *et al.* 2023, Namirad *et al.* 2023; Pawar *et al.* 2023; Ross *et al.* 2023; Zayed *et al.* 2023). La biodetección representa una de las estrategias más prometedoras para hacer frente a las pandemias, democratizando las oportunidades que ofrecen sus diversas y versátiles modalidades (Erdem *et al.* 2022) que apuntan a una integración sin precedentes de sensores, métodos bioanalíticos, conectividad e informática. Solo una combinación de científicos, clínicos e ingenieros puede desarrollar (Couvreur 2023; Hou *et al.* 2023; Huang *et al.* 2020; Lima *et al.* 2022) plataformas prácticas para aplicaciones desde el laboratorio hasta el entorno clínico.

Es fundamental unir los esfuerzos (Couvreur 2023; Vásquez y Orozco 2023) en biología, medicina, ciencia clínica, metrología, proceso de datos, algoritmos de aprendizaje profundo, e inteligencia artificial para avanzar en el desarrollo de herramientas integradas para la prevención, diagnóstico, monitorización, y tratamiento de la enfermedad. La comunidad científica ha abierto las puertas a las lecciones aprendidas de los aspectos interdisciplinarios (Madurantakam *et al.* 2022) como inmunología, ingeniería, patología, ciencia de los materiales, nanociencia, electroquímica, enfermedades infecciosas, virología, bilogía celular y molecular, medicina de emergencia, ciencias medioambientales, genética, biología molecular, y proteómica. «To deal with one's own concerns is obsolete. It is now necessary to work in an interdisciplinary manner» (Malhaire y Lagarce 2015). «Today, science has few borders, and collaboration is the name of the game» (Jalali-Hervay *et al.* 2015).

BIBLIOGRAFÍA

ABBAS, A., EKOWATI, D., SUHARIADI, F., ANWAR, A. & FENITRA, R. (2024), Technology Acceptance and COVID-19: A Perspective for Emerging Opportunities from Crisis. Technology Analysis & Strategic Management; 36(11): 3551-3563.

ABDULLAH, M., ALI, A., USMAN, M., ..., QURESHI, J.A., BAJABER, M.A. & XANG, X. (2023), Post COVID-19 Complications and Follow Up Biomarkers. Nanoscale Advances 5(21): 5705 (12 pp).

ABRHA, F., WONDIMU, T.H., KAHSAY, M.H., BAKARE, F.F., ANDOSHE, D.M. & KIM, J.Y. (2023), Graphene-based Biosensors for Detecting Coronavirus: A Brief Review. Nanoscale 15(45): 18184-18197.

ABUALIGAH, L., ABD ELAZIZ, M., SUMARI, P., GEEM, Z.W. & GANDOMI, A.H. (2021), Reptile Search Algorithm (RSA): A Nature-Inspired Meta-Heuristic Optimizer. Expert Systems with Applications 191: 116158 (33 pp).

ACADÉMIE NATIONALE DE PHARMACIE (2021), Chimie pour la pharmacie et les sciences pharmaceutiques, Rapport validé par le Conseil d'Administration du 8 décembre 2021.

ACADÉMIE NATIONALE DE PHARMACIE (2020), COVID-19 et médicament. Il est urgent de refaire confiance à la chimie, Communiqué de presse, le 30 mars 2020.

ACHARJEE, A., RAY, A., SALKAR, A., ..., AGRAWAL, S., DUTTAGUPTA, S. & SRIVASTAVA, S. (2023), Humoral Immune Response Profile of COVID-19 Reveals Severity and Variant-Specific Epitomes: Lessons from SARS-CoV-2 Peptide Microarray. Viruses 15(1): 248 (18 pp).

ADHIKARI, A., MANDAL, D., RANA, D., ..., ORASUBU, J.T., DE, S. & CHARROPADHAY, D. (2023), COVID-19 Mitigation: Nanotechnological Intervention, Perspective, and Future Scope. Materials Advances 4: 52 (27 pp).

ADRAH, F.A., DENU, M.K. & BUASU, M.A.E. (2023), Nanotechnology Applications in Healthcare with Emphasis on Sustainable COVID-19 Management. Journal of Nanotechnology Research 5(2): 6-13.

AHAD, A. & TAHIR, M. (2023), Perspective-6G and IoT for Intelligent Healthcare: Challenge and Future Directions. ECS Sensor Plus 2: 011601 (4 pp).

AHMAD, H.F., RAFIQUE, W., RASOOL, R., ALHUMAN, A., ANWAR, Z. & QADIR, J. (2023), Leveraging 6G Extended Reality, and IoT Big Data Analytics for Healthcare: A Review. Computer Science Review 48: 100558 (24 pp).

AHMED, S., ANSARI, A., SIDDIQUI, M.A., ..., KUMARI, B., KHAN, A. & RANJAN, P. (2023), Electrochemical and Optical-Based Systems for SARS-CoV-2 and Various Pathogens Assessment. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology 14(3): 033001.

AITHAL, S. MISHRIKI, S., GUPTA, R., ..., TANVIR, S., HANSON, R.W. & PURI, I.K. (2022), SARS-CoV-2 Detection with Aptamer- Functionalized Gold Nanoparticles. Talanta 236: 122841.

AKINYELU, A.A. & BAH, B. (2023), COVID-19 Diagnosis in Computerized Tomography (CT) and X-Ray Scans Using Capsule Neural Network. Diagnostics 13: 1484 (28 pp).

ALAFEEF, M. & PAN, D. (2022), Diagnostic Approaches for COVID-19: Lessons Learned and the Path Forward. ACS Nano 16: 11545-11576.

ALAVI, A., BOGU, G.K., WANG, M., ..., LI, X., BAHMANI, A. & SNYDER, M.P. (2022), Real-Time Alerting System for COVID-19 and Other Stress Events Using Wearable Data. Nature Medicine 28: 175-184.

ALEXANDER, C., ANDERSON, H.S., ANDERSON, L.I., ..., NICHOLLS, I.A., O'MAHONY, J. & WHITCOMBE, M.J. (2006), Molecular Imprinting Science and Technology: A Survey of the Literature for the Years Up to and Including 2003. Journal of Molecular Recognition 19(2): 106-180.

ALHAYANI, B., KWEKHA-RASHID, A.S., MAJAAN, H.B., ..., UKE, N., ALKHAYYAT, A. & MOHAMMED, H.J. (2023), 5G Standards for the Industry 4.0 Enabled Communication Systems Using Artificial Intelligence: Perspective of Smart Healthcare System. Applied Nanoscience 13(3): 1807-1817.

ALI, G.K. & OMER, K.M. (2022), Nanozyme and Stimulated Fluorescent Cu-Based Metal-Organic Frameworks (Cu-MOFs) Functionalized with Engineered Aptamers as a Molecular Recognition Element for Thrombin Detection in the Plasma of COVID-19 Patients. ACS Omega 7(41): 36804-36810.

ALI, O., ABDELBAKI, W., SHRESTHA, A., ELBASI, E., ALRYALAT, M.A.A. & DWIVEDI, Y.K. (2023), A Systematic Literature Review of Artificial Intelligence in the Healthcare Sector: Benefits, Challenges, Methodologies, and Functionalities. Journal of Innovation & Knowledge 8: 100333 (19 pp).

ALMÁSI, M. (2021), A Review on State of Art and Perspectives of Metal-Organic Frameworks (MOFs) in the Fight against Coronavirus SARS-CoV-2. Journal of Coordination Chemistry 74(13): 2111-2127.

ALORAIJ, Y.M., SUAIFAN, G.A.R.Y., SHIBL, A., ALKATTAN, K. & XOUROB, M. (2023), Development of Rapid Aptamer-Based Screening Assay for the Detection of COVID-19 Variants. ACS Omega 8(36): 32877-32833.

AMINI, R., ZHANG, Z., LI, J., GU, J., BRENNAN, J.D. & LI, Y. (2022), Aptamer for SARS-CoV-2: Isolation, Characterization and Diagnostics and Therapeutic Developments. Analysis & Sensing 2, e202200012 (18 pp).

AMIRI-DASHATAN, N., KOUSHKI, M. & REZAEI-TAVIRANI, M. (2022), Mass Spectrometry-Based Proteomic Research to Fight COVID-19: An Expert Review on Hopes and Challenges. OMICS: A Journal of Integration Biology 26(1): 19-34.

ANTIOCHIA, R. (2021), Paper-Based Biosensors: Frontiers in Point-of-Care Detection of COVID-19 Disease. Biosensors 11 (4): 110 (21 pp).

AROWOLO, M.O., OGUNDOKUN, R.O., MISRA, S., AGBOOLA, B.O. & GUPTA, B. (2023), Machine Learning-Based IoT System for COVID-19 Epidemics. Computing 105: 831-847.

ARTURI, F., MELEGARI, G., GIANSANTE, A., GIULIANI, E., BERTELLINI, E. & BARBIERI, A. (2023), COVID-19 Biomarkers for Critically Ill Patients: A Compendium for the Physician. Neurology International 15: 881-895.

ASKI, V.J., DHAKA, V.S., PARASHAR, A. & KUMAR, S., RIDA, I. (2023), Internet of Things in Healthcare: A Survey on Protocol Standards, Enabling Technologies, WBAN Architectures and Open Issues. Physical Communication 60: 102103.

ASLAN, Y., ATABAY, M., CHOWDHURY, H.K. & GÖKTÜRK, I. (2023), Aptamer-Based Point-of-Care Devices: Emerging Technologies and Integration of Computational Methods. Biosensors 13: 569 (34 pp).

ASUERO, A.G. (2020), Lecciones de la pandemia, ABC de Sevilla, 18 de junio.

ASUERO, A.G. (2023), Nanociencia, nanotecnología y nanoanalítica: anotaciones, historias y anécdotas, Discurso de ingreso como académico de número en la Real Academia Nacional de Farmacia, RANF: Madrid, 2 de marzo.

ASUERO, A.G. (ed.) (2022), Química y medida: de los orígenes a la miniaturización y a la nanoanalítica, Editorial Universidad de Sevilla (EUS): Sevilla.

ATES, H.C., YETISEN, A.K., GÜDER, F. & DINCER, C. (2021), Wearable Devices for the Detection of COVID-19. Nature Electronics 4: 13-14.

ATIENZA MACIAS, E. (2021), Legal Challenges for Robots and Autonomous Artificial Intelligence Systems in the Healthcare Context with Special Reference to COVID-19 Health Crisis. Ius et Scientia 7(1): 119-134.

AVENDAÑO LÓPEZ, C. (2020), Aportaciones de las ciencias biomédicas en el estado de alarma motivado por la pandemia del virus SARS-CoV-2. Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia 86(1): 9-17.

AYMERICH-FRANCH, L. & FERRER, I. (2022), Liaison, Safeward, and Well-Being: Analyzing the Role of Social Robots during the COVID-19 Pandemic. Technology in Society 70: 101993 (8 pp).

BAE, M., CHOI, S., KIM, J., SEO, G. & LEE, Y.W. (2024), Temperature-Insensitive Label-Free SARS-CoV-2 Spike Protein Detection Based on Complementary Refractive Index and Temperature Dependence of Multi-Mode Interference and Grating Resonance. Talanta 266: 125091 (11 pp).

BALERIOLA, E., TIRADO, F. & MOZO, A.G. (2023), Cosmoética y vacunas contra la COVID-19. Más allá de la propuesta cosmopolítica. ARBOR 199 (809): a713 (13 pp).

BARADOKE, A., JARUSAITIS, A., REINIKOVAITE, V., ..., DROBYSH, M., LIUSTROVAITE, V. & RAMANAVICIUS, A. (2024), Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Spike Protein by Screen-Printed Carbon Electrodes Modified by Colloidal Gold Nanoparticles. Talanta 268: 125279 (9 pp).

BARDHAN, N.M., RADISIC, M. & NURUNNABI, MD. (2023), Bioinspired Materials for Wearable Diagnostics and Biosensors. ACS Biomaterials Science Engineering 9: 2015-2019.

BAUER, I. (2023), Robots in Travel Clinics: Building on Tourism's Use of Technology and Robots for Infection Control during a Pandemic. Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines 9: 10 (9 pp).

BECHTOLD, P., WAGNER, P., HOSCH, S., ..., STARK, W.J., DAUBENBERGER, C.A. & SCHINDLER, T. (2021), Rapid Identification of SARS-CoV-2 Variants of Concern Using a Portable PeakPCR Platform. Analytical Chemistry 93 (49): 16350-16359.

BECK, S., NAKAJIMA, R., JASINKAS, A., ..., HEDDE, P.N., FELGNER, P.L. & ZHAO, W. (2022), A Protein Microarray-Based Respiratory Viral Antigen Testing Platform for COVID-19 Surveillance. Biomedicines 10: 2238 (20 pp).

BEDUK, T., DURMUS, C., HANOGLU, C.B., ..., GOKSELT, T., TURHAN, K. & TIMUR, S. (2021), Breath as the Mirror of Our Body Is the Answer Really Blowing in the Wind? Recent Technologies in Exhaled Breath Analysis Systems as Non-Invasive Sensing Platforms. Trends in Analytical Chemistry 143: 116329 (12 pp).

BHALLA, N., PAN, Y., YANG, Z. & PAYAM, A.F. (2020), Opportunities and Challenges for Biosensors and Nanoscale Analytical Tools for Pandemics: COVID-19. ACS Nano 14 (7): 7783-7807.

BI, H., YOU, R., BIAN, X. & LI, P. (2024), A Magnetic Control Enrichment Technique Combined with Terahertz Metamaterial Biosensor for Detecting SARS-CoV-2 Spike Protein. Biosensors and Bioelectronics 243: 115763 (11 pp).

BIDA, M.N., MOSITO, S.M., MIYA, T.V., DEMETRIOU, D., BLENMAN, K.R.M. & DLAMINI, Z. (2023), Transformation of the Healthcare Ecosystem in the Era of Society 5.0. En Society 5.0 and Next Generation Healthcare. Patient-Focused and Technology-Assisted Precision Therapies, Dlamini, Z. (ed.), Springer Nature: Cham, CH, pp. 223-248.

BIRHANU, A.G. (2023), Mass Spectrometry-Based Proteomics as an Emerging Tool in Clinical Laboratories. Clinical Proteomics 20: 32 (20 pp).

BISWAS, M., SAWAJAN, N., RUNGROTMONGKOL, T., SANACHAI, K., ERHADIAN, M. & SUKASEM, C. (2022), Pharmacogenetics and Precision Medicine Approaches for the Improvement of COVID-19 Therapies. Frontiers in Pharmacology 13: Article 835136 (40 pp).

BLOCHOUSE, E., EID, R., ARAJI, N., ..., LÉVÊQUE, N., THUILLIER, R. & POINOT, P. (2023), VOC-Based Probes, a New Set of Analytical Tools to Monitor Patient Health from Blood Sample. Proof of Concept on Tracking COVID-19 Infection. Analytical Chemistry 95: 11572-11577.

BOE (2023), Orden SND/726/2023, de 4 de julio, por la que se publica el Acuerdo del Consejo de Ministros de 4 de julio de 2023 por el que se declara la finalización de la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19. BOE Núm. 159 de miércoles 5 de julio de 2023.

BOGNÁR, Z., SUPALA, E., YARMAN, A., ..., BIER, F.F., SCHELLER, F.W. & GYURCSÁNYI, R.E. (2022), Peptide Epitope-Imprinted Polymer Microarrays for Selective Protein Recognition. Application for SARS-CoV-2 RBD Protein. Chemical Science 13(5): 1263-1269.

BOIVIN, L. & HARVEY, P.D. (2023), Virus Management Using Metal-Organic Framework-Based Technologies. ACS Applied Materials Interfaces 15(11): 13844-13859.

BOUKLI, N., FLAMAND, C., CHEA, K.L., ..., AUERSWALD, H., HORM, V.S. & KARLSSON, E.A. (2023), One Assay to Test Them All: Multiplex Assays for Expansion of Respiratory Virus Surveillance. Frontiers in Medicine 10: 1161268 (8 pp).

BUDD, J., MILLER, B.S., WEKMAN, N.E., ..., RODRIGUEZ, B., PEELING, R.W. & McKENDRY, R.A. (2023), Lateral Flow Test Engineering and Lesson Learned from COVID-19. Nature Reviews Bioengineering 1: 13-31.

BURDINO, E., CERUTTI, F., PANERO, F., ..., ALTAVILLA, A., APRÀ, F. & GHISETTI, V. (2022), SARS-CoV-2 Microfluidic Antigen Point-of-Care Testing in Emergency Room Patients during COVID-19 Pandemic. Journal of Virological Methods 299: 114337 (3 pp).

BURKI, K. (2023), First Shared SARS-CoV-2 Genome: GISAID vs Virological.org. Lancet/ microbe 4: e 395 (1 p).

BUSSE, R., MUSCAT, N.A., DE LA MATA, I. & FIGUERAS, J. (2022), Editorial. Lessons Learned from the COVID-19 Pandemic. Health Policy 126(5): 348-354.

CANCIU, A., CERNAT, A., TERTIS, M., GRAUR, F. & CRISTEA, C. (2023), Tackling the Issue of Healthcare Associated Infections through Point-of-Care Devices. Trends in Analytical Chemistry 161: 116983 (13 pp).

CAPELLA, J.V., BONASTRE, A., CAMPELO, J.C., ORS, R. & PERIS, M. (2020), IOT & Environmental Analytical Chemistry: Towards a Profitable Symbiosis. Trends in Environmental Analytical Chemistry 27: e00095 (8 pp).

CARABELLI, A.M., PEACOK, T.P, THORNE, L.G., ..., DE SILVA, T.I., TOWERS, G.J. & ROBERTSON, A.L. (2023), SARS-CoV-2 Variant Biology: Immune Escape, Transmission and Fitness. Nature Reviews Microbiology 21: 162-177.

CARPENTER, R.E., TAMRAKAR, V., CHAHAR, H., VINE, T. & SHARMAN, R. (2022), Confirming Multiplex RT-qPCR Use in COVID-19 with Next Generation Sequencing: Strategies for Epidemiological Advantage. Global Health, Epidemiology and Genomics Art. ID 2270965 (10 pp).

CASTELLANOS, M. & SOMOZA, A. (2023), Emerging Clinically Tested Detection Methods for COVID-19. FEBS Journal 290: 3809-3104.

CAVE, H. (2022), The Polymerase Chain Reaction, so Simple, so Clever: The Discovery Come True. Haematologia 107(8): 1737-1738.

CDC-NIH (2020), Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6 th ed., revised June 2020, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute of Health.

CDC, COVID-19 (2023), SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions, Updated Sept 1, 2023, Centers for Disease Control and Prevention.

CEBALLA-KOUKOULA, A., ROSS, G.M.S, BOSMAN, A.J., ZHAO, Y., ZHOU, H., MELEN, M.W.F., RAFFERTY, K., ELLIOTT, C.T. & SALENTIJA, G.I.J. (2023), Best Practice and Current Implementation of Emerging Smartphone Based (Bio)sensors. Part 2. Development, Validation and Social Impact. Trends in Analytical Chemistry 161: 116986 (17 pp).

CEN, X., WANG, F., HUANG, X., JOVIC, D., DUBEE, F., YANG, H. & LI, Y. (2023), Towards Precision Medicine: Omics Approach for COVID-19. Biosafety and Health 5: 78-88.

CHANG, Z.Y., ALHAMAMI, F.A.M.S. & CHIN, K.L. (2023), Aptamer-Based Strategies to Address Challenges in COVID-19 Diagnosis and Treatments. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, ID 9224815 (16 pp).

CHANNA, A., POPESCU, N., SKIBINSKA, J. & BURGER, R. (2021), The Rise of Wearable Devices during the COVID-19 Pandemic: A Systematic Review. Sensors 21: 5787 (22 pp).

CHATTERJEE, P., BISWAS, M. & DAS, A.K. (2021), Specialized COVID-19 Detection Techniques with Machine Learning. J. Physics: Conference Series 1798: 012033 (13 pp).

CHATTERJEE, T.N., CHAKROBORTY, S. & BANDYOPADHYAY, R. (2023), Detection of Viruses by Molecularly Imprinted Polymer Based Smart Sensors: The Current Scenario. Sensing and Imaging 24: Art. 34 (29 pp).

CHAUDHARY, K.R., KUJUR, S. & SINGH, K. (2023), Recent Advances of Nanotechnology in COVID-19: A Critical Review and Future Perspective. OpenNano 9: 100118 (24 pp).

CHEN, D-Y., TURCINOVIC, J., FENG, S., ..., BAKER, S.C., CONNOR, J.H. & SAEED, M. (2023a), Cell Culture Systems for Isolation of SARS-CoV-2 Clinical Isolates and Generation of Recombinant Virus. iScience 26: 106634 (21 pp).

CHEN, J., WANG, R., HOZUMI, Y., ..., QIU, Y., WEI, X. & WEI, G-W. (2023b), Emerging Dominants SARS-CoV-2 Variants. Journal of Chemical Information and Modeling 63: 335-342.

CHEN, L., LIU, W., ZHANG, Q., ..., SHI, M., LAN, K. & LIU, Y. (2020), RNA Based MNGS Approach Identifies a Novel Human Coronavirus from Two Individual Pneumonia Cases in 2019 Wuhan Outbreak. Emerging Microbes Infections 9(1): 313-319.

CHEN, M. & ZHANG, X.-E. (2021), Construction and Applications of SARS-CoV-2 Pseudoviruses: A Mini Review. International Journal of Biological Sciences 17(6): 1574-1580.

CHEN, Y., FENG, L., HAN, Y., ..., CHANG, L., LI, J. & ZHANG, R. (2023c), Performance Evaluation of SARS-CoV-2 Antigen Detection in the Post-Pandemic Era: Multilaboratory Assessment. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 61(12): 2237-2247.

CHEN, Y., LIU, Q., ZHOU, L., ZHOU, Y., YAN, H. & LAN, K. (2022), Emerging SARS-CoV-2 Variants. Why, When, and What's Next? Cell Insight 1: 100029 (7 pp).

CHENG, L., LAN, L., RAMALINGAM, M., HE, J., YANG, Y., GAO, M. & SHI, Z. (2023), A Review of Current Effective COVID-19 Testing Methods and Quality Control. Archives of Microbiology 205(6): 239 (28 pp).

CHIARA, M., D'ERCHIA, A.M., GISSI, C., ..., PAVESI, G., HORNER, D.S. & PESOLE, G. (2021), Next Generation Sequencing of SARS-CoV-2 Genomes: Challenges, Applications and Opportunities. Briefings in Bioinformatics 22(2): 616-630.

CHILIN, L., HETRICK, B. & WU, Y. (2023), Application of Ha-CoV-2 Pseudovirus for Rapid Quantification of SARS-CoV-2 Variants and Neutralizing Antibodies. Journal of Visualized Experiments 8 (199): doi 10.3791/65793.

CHOI, H.K. & YOON, J. (2023), Nanotechnology-Assisted Biosensors for the Detection of Viral Nucleic Acids: An Overview. Biosensors 13(2): 208 (24 pp).

CHOI, J.W., SEO, W.H., KANG, T., KANG, T. & GEUNG, B.G. (2023), Droplet Digital Recombinase Polymerase Amplification for Multiplexed Detection of Human Coronavirus. Lab on a Chip 23(10): 2389 (11 pp).

CHUG, V., BASU, A., KAUSHIK, A. & BASU, A.K. (2023), E-Skin-Based Advanced Wearable Technology for Health Management. Current Research in Biotechnology 5: 100129 (5 pp).

CLARK, T.N., LINDSLEY, K., WIGMOSTA, T.B., BHAGAT, A., HEMMERT, R.B., UYEI, J. & TIMBROOK, T.T. (2023), Rapid Multiplex PCR for Respiratory Viruses Reduces Time to Result and Improves Clinical Care: Result of a Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Infection 86(5): 462-475.

COSSART, P. (2021), Deux femmes récompensées conjointement par le prix Nobel : un inédit ! Actualités Chimiques N.º 460-461 : 7-8.

COUVREUR, P. (2023), Quelles leçons tirer de l'épidémie de la COVID-19 ? Comment la chimie peut nous aider à préparer les prochaines épidémies ? L'Actualité chimique 483 : 4-7 (Avril).

COX, C., KATES, J., CUBANSKI, J. & TOLBERT, J. (2023), The End of the COVID-19 Public Health Emergency: Details on Health Coverage and Access; https://www.kff.org/policy-watch/the-end-of-the-covid-19-public-health-emergency-details-on-health-coverage-and-access/

CRESPO-BELLIDO, A. & DUFFY, S. (2023), The How of Counter Defence: Viral Evolution to Combat Host Immunity. Current Opinion in Microbiology 74: 102320 (9 pp).

CUENI, T. (2023), Lessons Learned from COVID-19 to Stop Future Pandemics. Lancet 401 (10385): 1340.

CUEVAS-FERRANDO, E., SÁNCHEZ, G. & PÉREZ-CATALUÑA, A. (2024), SARS-CoV-2 and Genome Sequencing in Urban Wastewaters. Methods in Molecular Biology 2732: 119-131.

CUI, X., WANG, Y., ZHAI, J., XUE, M., ZHENG, C. & YU, L. (2023), Future Trajectory of SARS-CoV-2: Constant Spillover Back and Forth between Humans and Animals. Virus Research 328: 19075 (8 pp).

DA SILVA, S.J.R., DO NASCIMENTO, J.C.F., MENDES, R.P.G., ..., KOHL, A., PARDEE, K. & PENA, L. (2022), Two Years into the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned. ACS Infectious Diseases 8 (9): 1758-1814.

DA SILVA, S.J., SA SILVA, C.T.A., GUARINES, K.M., MENDES, R.P.G., KOHL, A. & PENA, L. (2020), Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. ACS Infectious Diseases 6 (9): 2319-2336.

DAS, A., BEJ, S., PANDIT, N.R., BANERJEE, P. & BISWAS, B. (2023a), Recent Advancements of Metal-Organic Frameworks in Sensing Platforms: Relevance in the Welfare of the Environment and the Medical Sciences with Regard to Cancer and SARS-CoV-2. Journal of Materials Chemistry A 11(12): 6090 (38 pp).

DAS, D., LIN, C.-W. & CHUANG, H.-S. (2024), On-Chip Screening of SARS-CoV-2 cDNA by LAMP-Integrated Rotational Diffusometry. Talanta 287: 125253 (9 pp).

DAS, S., AYUS, I. & GUPTA, D. (2023b), A Comprehensive Review of COVID-19 Detection with Machine Learning Techniques. Health and Technology 13: 679-692.

DAS, S.R. & KUNDU, C.N. (2023), Advances in Nanomedicine for the Treatment of Infectious Diseases Caused by Viruses. Biomaterials Science 11: 3431 (19 pp).

DASGUPTA, A., GANGAIS, S., NARAYAN, R. & KAPOOR, S. (2023), Mapping the Lipid Signatures in COVID-19 Infection: Diagnostics and Therapeutics Solutions. Journal of Medicinal Chemistry 66(21): 14411-14433.

DASH, S.R. & KUNDU, C.N. (2023), Advances in Nanomedicine for the Treatment of Infectious Diseases Caused by Viruses. Biomaterials Science 11(10): 3431 (19 pp).

DAVIS, I.M. (2021), SARS-CoV: Lessons Learned; Opportunities Missed for SARS-CoV-2. Reviews in Medical Virology 31: e2153 (6 pp).

DE ALMEIDA, C.M., MOTTA, L.C., FOLLI, G.S., ..., MILL, J.G., FILGUEIRAS, P.R. & ROMAO, W. (2022), MALDI(+) FT-ICR Mass Spectrometry (MS) Combined with Machine Learning toward Saliva-Based Diagnostic Screening for COVID-19. Journal of Proteome Research 21(8): 1868-1875.

DE LUCA, P., NAGY, J.B. & MACARIO, A. (2023), Nanomaterials Used in the Preparation of Personal Protective Equipment (PPE) in the Fight against SARS-CoV-2. Inorganics 11: 294 (22 pp).

DECHANT, P.-P. & TWAROCK, R. (2021), Models of Viral Capsid Symmetry as a Driver of Discovery in Virology and Nanotechnology. The Biochemist (London) 43(1): 20-24.

DEFI, I.R., ISKANDAR, S., CHARISMAWAKI, S., TURNIP, A. & NOVITA, D. (2022), Healthcare Worker's Point of View on Medical Robotics during COVID-19 Pandemic – A Scoping Review. International Journal of General Medicine 15; 3767-3777.

DEVI, D.H., DURAISAMY, K., ARMGHAN, A., ..., SORATHIYA, V., DAS, S. & RASHID, N. (2023), 5G Technology in Healthcare and Wearable Devices. Sensors 23: 2529 (21 pp).

DESAI, A.V., VORNHOLT, S.M., MAYOR, L.L., ..., JANIAK, C., SMITH, T.K. & MORRIS, R.R. (2023), Surface-Functionalized Metal-Organic Frameworks for Binding Coronavirus Proteins. ACS Applied Materials Interfaces 15(7): 9058-9065.

DHAWANT, T. & DANGLA, R. (2019), History of Digital PCR. 2019 Stilla Technologies (8 pp).

DÍAZ-ÁLVAREZ, M., TURIEL, E. & MARTIN-ESTEBAN, A. (2023), Recent Advances and Future Trends in Molecularly Imprinted Polymer-Based Sample Preparation. Journal of Separation Science 46 (12): 2300157 (18 pp).

DIEULIS, D. & GIORDANO, J. (2023), Responding to Future Pandemics: Biosecurity Implications and Defence Considerations. The US Army War College Quarterly Parameters 53(2), Art. 8 (12 pp).

DIKDAN, R.J., MARRAS, S.A.E., FIELD, A.P., BROWNLEY, A., CIRONI, A., HILL, A. & THAGI, S. (2022), Multiplex PCR Assays for Identifying All Major Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants. The Journal of Molecular Diagnostics 24(4): 309-319.

DO, T., GURAN, R., ADAM, V. & ZITKA, O. (2022), Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Virus Identification: A Review. Analyst 147: 3131-3154.

DONG, T., WANG., M., LIU, J., MA, P., PANG, S., LIU, W. & LIU, A. (2023), Diagnostics and Analysis of SARS-CoV-2: Current Status, Recent Advances, Challenges and Perspectives. Chemical Science 14(23): 6149 (58 pp).

DUBEY, A., CHOUDHARY, S., KUMAR, P. & TOMAR, S. (2022), Emerging SARS-CoV-2 Variants: Genetic Variability and Clinical Implications. Current Microbiology 79: 20 (18 pp).

DWIVEDI, R., MEHROTRA, D. & CHANDRA, S. (2022), Potential of Internet of Medical Things (IoMT) Applications in Building a Smart Healthcare System: A Systematic Review. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research 12(2): 302-318.

ECDT Technical Report (2023), Lessons from the COVID-19 Pandemic, May 2023.

EHTESABI, H. & AFZALPOUR, E. (2023), Smartphone-Based Corona Virus Detection Using Saliva: A Mini-Review. Helyon 9: e14380 (11 pp).

EL-DERANY, M.O., HANNA, D.M.F., YOUSHIA, J., EL-MOWAFY, E., FARAG, M.A. & AZAB, S.S. (2023), Metabolomics-Directed Nanotechnology in Viral Diseases Management: COVID-19 a Case Study. Pharmacological Reports 75: 1045-1065.

EL-MAGHRABEY, M., MAGDY, G., HASHEM, H.M., ..., RADWAN, A.S., EL-SHERBENY, M.A. & EL-SHALENY, R. (2023), Comprehending COVID-19 Diagnostic Tests and Greenness Assessment of Its Reported Detection Methods. Trends in Analytical Chemistry 169: 117379 (17 pp).

ELLINGTON, A. (2014), On Aptamers; https://ellingtonlab.org/blog/2014/12/1/on-aptamers

EQUILS, O., BAKAJ, A., WILSON-MIFSUD, B. & CHATTERJEE, A. (2023), Restoring Trust: The Need for Precision Medicine in Infectious Diseases, Public Health and Vaccines. Human Vaccines & Immunotherapeutics 19(2): 2234787 (5 pp).

ERDEM, Ö, ES; I., SAYLAN, Y. & INCI, F. (2022), Unifying the Efforts of Medicine, Chemistry, and Engineering in Biosensing Technologies to Tackle the Challenges of the COVID-19 Pandemic. Analytical Chemistry 94(1): 3-25.

ESCADAFAL, C., BALDAN, R., DE VOS, M., ..., BAUSCH, D.G., VESSIÈRE, A. & SACKS, J.A. (2023), Evaluating Diagnostic Tests during Outbreaks: Challenges and Lessons Learnt from COVID-19. BMJ Global Health 8: e012506 (4 pp).

ESMAIL, S., KNAUER, M.J., ABDOH, H., ..., BHAYANA, V., CHIN-YEE, I. & LI, S.S-C. (2021), Rapid and Accurate Agglutination-Based Testing for SARS-CoV-2 Antibodies. Cell Reports Methods 1: 10011 (10 pp).

ESPIN, E., YANG, C., SHANNON, C.P., ASSADIAM, S., HE, D. & TEBBUTT, S.J. (2023), Cellular and Molecular Biomarkers of Long COVID: A Scoping Review. Biomedicine 91: 10452 (17 pp).

EUROPEAN UNION (2016), EPRS – European Parliamentary Research Services Scientific Foresight Unit-STOA.

EVERITT, M.L., TILLERY, A., DAVID, M.G., SINGH, N., BORISON, A. & WHITE, I.M. (2021), A Critical Review of Point-of-Care Diagnostic Technologies to Combat Viral Pandemics. Analytica Chimica Acta 1146: 184-199.

FAHAM, S., SALIMI, A. & GHAVANI, R. (2023), Electrochemical-Based Remote Biomarker Monitoring: Toward Internet of Wearable Things in Telemedicine. Talanta 213: 123892 (19 pp).

FAN, Y., LI, X., ZHANG, L., WAN, S., ZHANG, L. & ZHOU, F. (2022), SARS-CoV-2 Omicron Variant: Recent Progress and Future Perspectives. Signal Transduction and Targeted Therapy 7: 141 (11 pp).

FELDBERG, L., ZVI, A., YAHALOM-RONEN, Y. & SCHUSTER, O. (2023), Discriminative Identification of SARS-CoV-2 Variants Based on Mass-Spectrometry Analysis. Biomedicines 11: 2373 (10 pp).

FENG, W., NEWBIGGING, A.M., LE, C., ..., ZHANG, X-E., CHANG, H. & LE, X.C. (2020), Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs. Analytical Chemistry 92 (15): 10196-10209.

FENG, X. & WANG, H. (2023), Emerging Landscape of Nanobodies and Their Neutralizing Applications against SARS-CoV-2 Virus. ACS Pharmacology & Translational Science 6(7): 925-942.

FRAGKOU, P.C., MOSCHOPOULOS, C.D., DIMOPOULOU, D., ..., SANGUINETTI, M., CHUNG, H-R. & SKEVAKY, C. (2023), Performance of Point of Care Molecular and Antigen Based Tests for SARS-CoV-2:

A Living Systematic Review and Meta-Analysis. Clinical Microbiology Infection 29(3): 291-301.

FU, J., LIU, T., TOUHID, S.S.B., FU, R. & LIU, X. (2023), Functional Textile Materials for Blocking COVID-19 Transmission. ACS Nano 17(3): 1739-1763.

FUTANE, A., NARAYANAMURTHY, V., JADHAV, P. & SRINIVASAN, A. (2023), Aptamer-Based Rapid Diagnosis for Point-of-Care Application. Microfluids and Nanofluids 27(2): 15 (33 pp).

GAJULA, S.N.R., KHAIRNAR A., JOCK, P. & KUMARI, N. (2023), LC-MS/MS: A Sensitive and Selective Analytical Technique to Detect COVID-19 Protein Biomarkers in the Early Disease Stage. Expert Review of Proteomics 20 (1-3): 5-18.

GALA, J.-L. (2022), Management du risqué sanitaire: retour d'expérience de la pandémie COVID-19. L'Actualité Chimique 472: 30-38 (Supp 2 pp) (Avril).

GALETSI, P., KATSALIAKI, K. & KUMAR, S. (2023), Exploring Benefits and Ethical Challenges in the Rise of mHealth (Mobile Healthcare) Technology for the Common Good: An Analysis of Mobile Applications for Health Specialists. Technovation 121: 102598 (16 pp).

GHADERISHEKHIABADI, P., IRANI, M., NOORISEPEHR, M. & MALEKI, A. (2023), Magnetic Biosensors for Identification of SARS-CoV-2, Influenza, UIV, and Ebola Viruses: A Review. Nanotechnology 34: 272001 (31 pp).

GHORBANIZAMANI, F., MOULAHOUM, H., CELIK, E.G. & TIMUR, S. (2023), Material Design in Implantable Biosensors toward Future Personalized Diagnostics and Treatments. Applied Sciences 13, 4630 (21 pp).

GHOSAL, K. (2023), Tackling COVID-19 Using Antiviral Nanocoating's Recent Progress and Future Challenges. Particle & Particle Systems Characterization 40: 2200154 (18 pp).

GHOUEIMY, A., MAHAS, A., MARSIC, T., AMAN, R. & MAHFOUZ, M. (2023), CRISP-Based Diagnostics: Challenges and Potential Solutions towards Point-of-Care Applications. ACS Synthetic Biology 12(1): 1-16.

GIBNEY, E. (2020), The Pandemic Mixed Up What Scientists Study- and Some Won't Go Back. Nature 582 (7811): 173-174.

GINNEKEN, E. van, WEBB, E., MARESO, A. & CYLUSON, J. (2022), Editorial. Lesson Learned from the COVID-19 Pandemic. Health Policy 126 (5): 348-354.

GOHARSHADI, E.K., GOHARSHADI, K. & MOGHAYEDI, M. (2022), The Use of Nanotechnology in the Fight against Viruses: A Critical Review. Coordination Chemistry Reviews 464: 214559 (29 pp).

GOLD, L. (2006), Epilogue. A Personal Perspective of Aptamers after 15 Years. En The Aptamer Handbook, Ed. S. Klussmann, Wiley-VCH Verlag GmbH.

GOLD, L. (2015), SELEX: How it Happened and Where it Will Go. Journal of Molecular Evolution 81: 140-143.

GOMEZ, C.E., PERDIGUERO, B. & ESTEBAN, M. (2021), Emerging SARS-CoV-2 Variants and Impact in Global Vaccination Programs against SARS-CoV-2/COVID-19. Vaccines 9: 243 (12 pp).

GOWDA, S.G.B., SHEKHAR, C., GOWDA, D., CHEN, Y., CHIBA, H. & HUIS, S.-P. (2024), Mass Spectrometric Approaches in Discovering Lipid Biomarkers for COVID-19 by Lipidomics: Future Challenges and Perspectives. Mass Spectrometry Reviews; 43(5): 1041-1065.

GRAHAM, B.S. & SULLIVAN, N.J. (2018), Emerging Viral Diseases from a Vaccinology Perspective: Preparing for the Next Pandemic. Nature Immunology 19: 20-28.

GSANGAYA, K. R., HAJJAJ, S. S. H., SULTAN, M. T. H., SHAHAR, F. S. & SHAH, A. U. M. (2022), Portable IoT Body Temperature Screening System to Combat the Adverse Effects of COVID-19. Journal of Sensors and Actuator Networks 11: 22 (13 pp).

GUO, J., CHEN, S., TIAN, S., ..., KANG, Y., MA, X. & GUO, J. (2021), 5 G Enabled Ultra-Sensitive Fluorescence Sensor for Proactive Prognosis of COVID-19. Biosensors and Bioelectronics 181: 113160 (8 pp).

GUPTA, R., GUPTA, P., WANG, S., ..., PARIKH, B.A., GENIN, G.M. & SINGAMANENI, S. (2023), Ultrasensitive Lateral-Flow Assays Via Plasmonically Active Antibody-Conjugated Fluorescent Nanoparticles. Nature Biomedical Engineering 7: 1556-1570.

HADYNSKI, J.C., DIGGINGS, J., GOAD, A., ..., KRAUS, P., LUFKIN, T. & WRIEDT, M. (2023), Metal-Organic Framework as a Fluorescent and Colorimetric Dual Signal Readout Biosensor Platform for the Detection of a Genetic Sequence from the SARS-CoV-2 Genome. ACS Applied Materials Interfaces 15(32): 38163-38170.

HALEEM, A., JAVAID, M., SINGH, R.P. & SUMAN, R. (2022), Medical 4.0 Technologies for Healthcare: Feature, Capabilities and Applications. Internet of Things and Cyber-Physical Systems 2: 12-30.

HAN, W.B., KO, G.-J., JANG, T.-M. & HWANG, S.-W. (2021), Materials, Devices, and Applications for Wearable and Implantable Electronics. ACS Applied Electrotonic Materials 3(2): 485-503.

HASSAN, I., FERNADES, G., MUKAIGAWRA, M. & SRIDHAR, D. (2023), Lesson from COVID-19 Must Be Learned before the Next Outbreak. Nature Medicine 29 (9): 2171-2173.

HE, X., JI, W., XING, S., ..., LU, S., DU, K. & LI, X. (2024), Emerging Trends in Sensors Based on Molecular Imprinting Technology: Harnessing Smartphones for Portable Detection and Recognition. Talanta 268, Part s1: 125283 (18 pp).

HEGGESTAD, J.T., BRITTON, R.J., KINNAMON, D.S., ..., HAYNES, B.F., WOODS, C.W. & CHILKOTI, A. (2023), COVID-19 Diagnosis and SARS-CoV-2 Strain Identification by a Rapid, Multiplexed, Point-of-Care Antibody Microarray. Analytical Chemistry 95(13): 5610-5617.

HETRICK, B., CHILIN, L.D., HES, S., ..., PETRICOIN, E.F., ANDABILI, A. & WU, Y. (2022), Development of a Hybrid Alphavirus-SARS-CoV-2 Pseudovirus for Rapid Quantification of Neutralization Antibodies and Antiviral Drugs. Cell Report Methods 2: 100181 (16 pp).

HILLARY, V.E. & CEASAR, S.A. (2023), An Update on COVID-19: SARS-CoV-2 Variants, Antiviral Drugs, and Vaccines. Helyon 9: e13952 (25 pp).

HINGER, A., AHAN, R.E., ARAS, E. & SEKER, U.O.S. (2023), Making the Next Generation of the Therapeutics: mRNA Meets Synthetic Biology. ACS Synthetic Biology 12(9): 2505-2515.

HODSON, R. (2022), Preparing the World for the Next Pandemic. Nature 610 (7933): S33.

HOU, F., SUN, S., ABDULLAH, S.W., TANG, Y., LI, X. & GUO, H. (2023), The Application of Nanoparticles in Point-of-Care Testing (POCT) Immunoassays. Analytical Methods 15(18): 2154 (27 pp).

HUANG, H., FAN, C., LI, M., ..., ZHENG, X., ZUO, X. & HUANG, J. (2020), COVID-19: A Call for Physical Scientists and Engineers. ACS Nano 14(4): 3747-3754.

HUANG, J., LI, W., BAI, X., XIAO, F. & XU, H. (2023), Metal-Organic Framework Detectives Meet Infectious Pathogens: A Powerful Tool against Pandemics. Coordination Chemistry Reviews 488: 215160 (27 pp).

HUFNAGEL, K., FATHI, A., STROH, N., ..., MERLE, U., ADDO, M.M. & SCHRÖDER, C. (2023), Discovery and Systematic Assessment of Early Biomarkers that Predict Progression to Severe COVID-19 Disease. Communications Medicine (London) 3(1): 51 (13 pp).

INGLET, S. (2022), Two Years of the COVID-19 Pandemic: What Lessons Have We Learned. Annals of Pharmacotherapy 56(2): 1376-1381.

INUWA, H.M., RAJA, A.R., KUMAR, A., SINGH, B. & SINGH, S. (2022), Status of Industry 4.0 Applications in Healthcare 4.0 and Pharma 4.0. Materials Today: Proceedings 62 (Part 6): 3593-3598.

IRKHAM, I., IBRAHIM, A.U., NWEKWO, C.W., AL-TURJMAN, F. & HARTATI, Y.W. (2023), Current Technologies for Detection of COVID-19: Biosensors, Artificial Intelligence and Internet of Medical Things (IoMT): Review. Sensors 23(1): 426 (27 pp).

ISLAM, M.A. (2024), A review of SARS-CoV-2 Variants and Vaccines: Viral Properties, Mutations, Vaccine Efficacy, and Safety. Infectious Medicine 2(4): 247-261.

IVANOSKA-DACIKJ., A., OGUZ-GOUILLART, Y., HOSSAIN, G., ..., WICK, P., CLEMENT, P. & SARAC, A.S. (2023), Advanced and Smart Textiles during and after the COVID-19 Pandemic: Issues, Challenges, and Innovations. Healthcare 11: 1115 (27 pp).

IZAC, J.R., KWEE, E.J., TIAN, L., ..., GAIGAAS, A.K., ELLIOT, J.T. & WANG, L. (2023), Development of a Cell-Based SARS-CoV-2 Pseudovirus Neutralization Assay Using Imaging and Flow Cytometry Analysis. International Journal of Molecular Sciences 2023, 23: 12332 (11 pp).

JACOBS, J.J., HAIDAR, G. & MELLORS, J.W. (2023), COVID-19: Challenges of Viral Variants. Annual Review of Medicine 74: 31-53.

JAIN, A., BAJAJ, S., JAIN, P., MAJUMDAR, A., SINGH, A. & SONI, P. (2023), A Review on Biotechnologically Derived Techniques to Combat COVID-19 Situation. Health Science Review 8: 100112 (14 pp).

JALALI-HERVAY, M., ARRASTRA, M. & GÓMEZ, F.A. (2015), How Chemometrics Improve Microfluidic Research. Analytical Chemistry 87(7): 3544-3555.

JAVAID, M., HALEEM, A., SINGH, R.P. & SUMAN, R. (2023), 5G Technology for Healthcare: Features, Serviceable Pillars, and Applications. Intelligent Pharmacy 1: 2-10.

JODLOWSKI, P.J., DYMEX, K., KUROWSKI, G., ..., PISKORZ, W., WNOROWSKI, A. & BOGUSZEWSKA-CZUBARA, A. (2022), Zirconium-Based Metal-Organic Frameworks as Acriflavine Cargos in the Battle against Coronaviruses – A Theoretical and Experimental Approach. ACS Applied Materials Interfaces 14(25): 28615-28627.

JOHN, G., SAHAJPAL, N.S., MONDAL, A.K., ..., CHAUBEY, A., ROJIANI, A. & KOLHER, R. (2021), Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modelling in Molecular Epidemiology. Currents in Issues Molecular Biology 43 (2); 845-867.

JOHN, P., VASA, N.J. & ZAM, A. (2023), Optical Biosensors for the Diagnosis of COVID-19 and Other Viruses – A Review. Diagnostics 13: 2418 (24 pp).

KALASIN, S. & SURAREUNGCHAI, W. (2023), Challenges of Emerging Wearable Sensors for Remote Monitoring toward Telemedicine Healthcare. Analytical Chemistry 95(3): 1773-1784.

KAMALOV, F., POURGHEBLEH, B., GHEISARI, M., LIU, Y. & MOUSSA, S. (2023), Internet of Medical Things Privacy and Security: Challenges, Solutions, and Future Trends from a New Perspective. Sustainability 15: 3317 (22 pp).

KARATAS, M., ERISKIN, L., DEVECI, M., PAMUCAR, D. & GARG, H. (2022), Big Data for Healthcare Industry

4.0: Applications, Challenges and Future Perspectives. Expert Systems with Applications 200: 116912 (15 pp).

KARKI, K., PRIYADARSHINI, S., KUMAR, P., ..., LATHER, A.S., POONIA, K. & NEHRA, A. (2024), Review on Current Race for Covid-19 Diagnosis. Biosensors and Bioelectronics: X 16: 100432 (14 pp).

KARIM, N., AFROJ, S., LLOYD, K., ..., FARMERY, A.D., KIM, I.-D. & NOVOSELOV, K.S. (2020), Sustainable Personal Protective Clothing for Healthcare Applications: A Review. ACS Nano 14(10): 12313-12340.

KARUPPAIAH, G., VASHIST, A., NAIR, M., VEERAPANDIAN, M. & MANICKAM, P. (2023), Emerging Trends in Point-of-Care Biosensing Strategies for Molecular Architectures and Antibodies of SARS-CoV-2. Biosensors and Bioelectronics X13: 100324 (21 pp).

KAUSHIK, A.K., DHAU, J.S., GOHEL, H., ..., KATEB, B., KIM, N.Y. & GOSWAMI, D.Y. (2020), Electrochemical SARS-CoV-2 Sensing at Point-of-Care and Artificial Intelligence for Intelligent COVID-19 Management. ACS Applied Bio Materials 3(11): 7306-7325.

KHAKSARINEJAD, R., ARABPOUR, Z., REZAKHANI, L., PARVIZPOUR, F. & RASMI, Y. (2022), Biomarker Based Biosensors: An Opportunity for Diagnosis of COVID-19. Reviews in Medical Virology 32: e2356 (18 pp).

KHAN, H., KUSHWAH, K.K., SINGH, S., URKUDE, H., MAURYA, M.R. & SASASIVUNI, K.K. (2021), Smart Technologies Driven Approaches to Tackle COVID-19 Pandemic. 3 Biotech 11: 50 (22 pp).

KHAN, R., DESHPANDE, A.S., PROTEASA, G. & ANDREESCU, S. (2024), Aptamer-Based Electrochemical Biosensor with S Protein Binding Affinity for COVID-19 Detection: Integrating Computational Design with Experimental Validation of S Protein Binding Affinity. Sensors and Actuators: B. Chemical 399: 13 4775 (8 pp).

KHAN, S., LLINA, E.J., DANOFF, S.K., LLINAS, R.H. & MARS, E.B. (2022), The Telemedicine Experience: Using Principles of Clinical Experience to Identify Disparities and Optimize Care. Medicine (Baltimore) 101(10): e29017 (8 pp).

KILGOUR, K.M., TURNER, B.L., DANIELE, M. & MENEGATTI, S. (2023), One-Step Quantification of Anti-COVID-19 Antibodies via Dual Affinity Ratiometric Quenching Assays. Analytical Chemistry 95(27): 10368-10375.

KIM, S. & LEE, J.-H. (2022), Current Advances in Paper-Based Biosensor Technologies for Rapid COVID-19 Diagnosis. BioChip Journal 16(4): 376-396.

KIM, S., BAEK, S., SLUYTER, R., KONSTANTINOV, K., KIM, J.H., KIM, S. & KIM, Y.H. (2023), Wearable and Implantable Bioelectronics as Eco-Friendly and Patient-Friendly Integrated Nanoarchitectonics for Next-Generation Smart Healthcare Technology. EcoMat e12356 (2023) (35 pp).

KLEIN, H.E. (2023), COVID-19 Fallow on Individuals, Economy, and Health System to Last for Years, White Paper Concludes. Evidence-Based Oncology 29(8): SP654-SP657.

KO, A. & LIAO, C. (2023), Paper-Based Colorimetric Sensors for Point of Care Testing. Analytical Methods 15(35): 4377 (28 pp).

KOBAYASHI, J., MATSUYAMA, S., SHIRAKURA, M., ..., WATANABE, S., HASEGAWA, H. & NAKAMURA, K. (2023), Use of the Particle Agglutination/Particle Agglutination Inhibition Test for Antigenic Analysis of SARS-CoV-2. Influenza and Other Respiratory Viruses 17(2): e13093 (8 pp).

KOUSHKI, E., MOWLAVI, A.A. & HOSEINI, S.T. (2023), Application of Localized Surface Plasmon Resonance of Conjugated Gold Nanoparticles in Spectral Diagnosis of SARS-CoV-2: A Numerical Study. Plasmonics 18: 1847-1855.

KOZLOWSKI, H.N., MALEKJAHANI, A., LI, V.Y.C., ..., MUBAREKA, S., GUBBAY, J.B. & CHAN, W.C.W. (2023), Genotyping SARS-CoV-2 Variants Using Ratiometric Nucleic Acid Barcode Panels. Analytical Chemistry 95(14): 5877-5885.

KRISHANTHI, G., JAYETILEKE, H, WU, J., LIU, C. & WANG, Y.-G. (2023), Enhancing Feature Selection Optimization for COVID-19 Microarray Data. COVID 3: 1336-1355.

KUMAR, A., PARIHAR, A., PANDA, U. & PARIHAR, D.S. (2022a), Microfluidic-Based Point-of-Care Testing (POCT) Devices in Dealing with Waves of COVID-19 Pandemic: The Emerging Solutions. ACS Applied Biomaterials 5 (5): 2046-2068.

KUMAR, M., RAJ, H., CHAURASIA, N. & GILL, S.S. (2023a), Blockchain Inspired Secure and Reliable Data Exchange Architecture for Cyber-Physical Healthcare System 4.0. Internet of Things and Cyber-Physical Systems 3: 309-322.

KUMAR, N.A., ARADHANA, S., HARLEEN & VISHNURAJ, M.R. (2023b), SARS-CoV-2 in Digital Era: Diagnostic Techniques and Importance of Nucleic Acid Quantification with Digital PCRs. Reviews in Medical Virology 33(5): e2471 (19 pp).

KUMAR, R., HARILAL, S., AL-SEHEMI, A.G., PANNIPARA, M., MATHEW, G. & MATHEW, B. (2023c), Advancement in COVID-19 Testing: An In-Depth Overview. Current Pharmacy Biotechnology 24(9): 1122-1148.

KUMAR, P., SARHAR, N., SINGH, A. & KLAUSJIK, M. (2022b), Nanopaper Biosensors at Point of Care. Bioconjugate Chemistry 33 (6): 1114: 1130.

KUMAR, S.N., SRIVASTAVA, A.K., HIREMATH, L., ..., PALLAVI, M.D., YUKTHA, K.M. & MALOSHKA, P. (2022c), Next Generation Sequencing in COVID-19 Analysis. International Journal of Advanced Research 11(1): 942-947.

LAGHRIB, F., SAQRANE, S., EL BOUABI, Y., FARANI, A., BAKASSE, M., LAHRICH, S. & EL MHAMMEDI, A. (2021), Current Progress on COVID-19 Related to Biosensing Technologies: New Opportunity for Detection and Monitoring of Viruses. Microchemical Journal 160: 105606 (9 pp).

LAI, Y.-J., LIU, S.-H., MANACHEVAKUL, S., LEE, T.-A., KUO, C.-T. & BELLO, D. (2023), Biomarkers in Long COVID-19: A Systematic Review. Frontiers in Medicine 10: 1085988 (10 pp).

LAND, K.J., BOERAS, D.I., CHEN, X.S., RAMSAY, A.R. & PEELING, R.W. (2019), REASSURED Diagnostics to Inform Disease Control Strategies Strengthen Health Systems and Improve Patient Outcomes. Nature Microbiology 4: 46-54.

LANYON, H.E., HOYLE, J.S. & DOWNARD, K.M. (2023), Resolving Omicron Sub-Variants of SARS-CoV-2 Coronavirus with MALDI Mass Spectrometry. Analyst 148 (5): 966-972.

LAZARI, L.C., DE OLIVEIRA, G.S., MACEDO DA SILVA, J., ROSA-FERNANDES, L. & PALMISANO, G. (2023), Mass Spectrometry and Machine Learning in the Identification of COVID-19 Biomarkers. Frontiers in Analytical Science 3: 1119438 (15 pp).

LE, X.C. (2021), Analytical Advances in Detecting SARS-CoV-2 and Further Research Needs for COVID-19 Testing. Analytical Chemistry 93 (24): 8379-8380.

LEE, D., LEE, T., HONG, J., ..., LEE, S.W., LEE, G. & YOUN, D.S. (2022), State-of-the-Art Nanotechnologies Used in the Development of SARS-CoV-2 Biosensors: A Review. Measurement Science Technology 33: 062002 (21 pp).

LEE, S., YOO, Y.K., HAN, S.I., ..., LEE, D., YOON, D.S. & LEE, J.H. (2023), Advancing Diagnostic Efficacy Using a Computer Vision-Assisted Lateral Flow Assay for Influenza and SARS-CoV-2 detection. Analyst 148 (23): 6001-6010.

LeMIEUX, J. (2020), Moving beyond PCR: Next Generation Sequencing Enters the COVID-19 Testing Arena. Clinical OMICS 7(4): 12-15.

LI, C., WANG, J., WANG, S. & ZHANG, Y. (2024a), A Review of IoT Applications in Healthcare. Neurocomputing 565: 127017 (12 pp).

LI, D., SUN, C., ZHUANG, P. & MEI, X. (2024b), Revolutionizing SARS-CoV-2 Omicron Variant Detection: Towards Faster and More Reliable Methods. Talanta 266: 124937 (22 pp).

LI, C.-J. & CHANG, S.-C. (2023a), SARS-CoV-2 Spike S2-Specific Neutralizing Antibodies. Emerging Microbes & Infections 12: 2220582 (14 pp).

LI, H., XIE, Y., CHEN, F., ..., GUO, X., HU, Q. & YIN, K. (2023b), Amplification-Free CRISP/Cas Detection Technology: Challenges, Strategies and Perspectives. Chemical Society Reviews 52(1): 361-382.

LI, P., LEE, G.-H., KIM, S.Y., KWON, S.Y., KIM. H.R. & PARK, S. (2021), From Diagnosis to Treatment: Recent Advances in Patient-Friendly Biosensors and Implantable Devices. ACS Nano 15 (2): 1960-2004.

LI, X., WANG, J., GENG, J., XIAO, L. & WANG, H. (2023c), Emerging Landscape of SARS-CoV-2 Variants and Detection Technologies. Molecular Diagnosis & Therapy 27(2): 159-177.

LI, Y., GUAN, C., LIU, C. & HAN, G. (2024c), Disease Diagnosis and Application Analysis of Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in Saliva Detection. Talanta 269: 125394 (16 pp).

LIANG, Q.-H., CAO, B.-P., XIAO, A. & WEI, D. (2023), The Application of Graphene Field-Effect Transistor Biosensors in COVID-19 Detection Technology: A Review. Sensors (Basel) 23(21): 8764 (15 pp).

LIMA, N.M., FERNANDES, B.L.M., ALVES, G.F., ..., MOREIRA, O.B.O., SUSSULINI, A. & DE OLIVEIRA, M.A.L. (2022), Mass Spectrometry Applied to Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targets Identification for the Novel Coronavirus SARS-CoV-2: A Review. Analytica Chimica Acta 1195: 339385 (19 pp).

LIN, C., LIU, Z., FANG, F., ..., TENG, Z., XIAO, R. & YANG, Y. (2023a), Next-Generation Rapid and Ultrasensitive Lateral Flow Immunoassay for Detection of SARS-CoV-2 Variants. ACS Sensors 8 (10): 3733-3743.

LIN, C.-F. & CHANG, S.-H. (2023), Advanced Mobile Communication Techniques in the Fight against the COVID-19 Pandemic Era and Beyond: An Overview of 5G/B5G/6G. Sensors 23: 7817 (16 pp).

LIN, Z., ZOU, Z., PU, Z., WU, M. & ZHANG, Y. (2023b), Application of Microfluidic Techniques on COVID-19 Diagnosis and Drug Discovery. Acta Pharmaceutica Sinica B 13(7): 2877-2896.

LIU, G. & RUSLING, J.F. (2021), COVID-19 Antibody Tests and their Limitations. ACS Sensors 6 (3): 593-612.

LIU, M., LIANG, Z., CHENG, J., ..., CHEN, H., ZHENG, P. & SUN, B. (2023a), SARS-CoV-2 Neutralising Antibody Therapies: Recent Advances and Future Challenges. Reviews in Medical Virology 33: e2464 (18 pp).

LIU, T., SIEGEL, E. & SHEN, D. (2022), Deep Learning and Medical Image Analysis for COVID-19 Diagnosis and Prediction. Annual Review of Biomedical Engineering 24: 179-201.

LIU, Y., KUMBLATHAN, T., JOYCE, M.A., ..., PANG, X., LI, X.-F. & LE, X.C. (2023b), Multiplex Assay Enable Simultaneous Detection and Identification of SARS-CoV-2 Variants of Concern in Clinical and Waste Water Samples. ACS Measurement Science Au 3(4): 258-268.

LIU, Y., LU, S., ZHANG, Z., YANG, Z., CUI, X. & LIU, G. (2023c), Printable Biosensors towards Next Generation Point of Care Testing: Paper Substrate as an Example. Lab on a Chip 23(15): 3328-3352.

LIU, Y., QIN, Z., ZHOU, J., ..., LI, H., WANG, G. & CHANG, H. (2023d), Nano-Biosensor for SARS-Cov-2/COVID-19 Detection: Methods, Mechanism and Interface Design. RSC Advances 13(26): 17883-17906.

LIU, Y., ZHOU, Y., XU, W., LI, J., WANG, S. & SHEN, X. (2023e), Aptamer-Based Kinetically Controlled DNA Reactions Couples with Metal-Organic Framework Nanoprobes for Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein. Analytical Methods 15(47): 6583-6589.

LOEZA-MEJÍA, C., SÁNCHEZ-DELACRUZ, E., POZOS-PARRA, P. & LANDERO-HERNÁNDEZ, L.-A. (2021), The Potential and Challenges of Health 4.0 to Face COVID-19 Pandemic: A Rapid Review. Health Technology 11: 1321-1330.

LOOI, M.-K. (2023a), COVID-19. Scientists Sound Alarm over New 2.86 Pirola Variant. BMJ 382: 1964.

LOOI, M.-K. (2023b), WHO Adds JN.1 as New Variant of Interest. BMJ 383: 2975.

LOZANO, D., LARRAGA, V., VALLET-REGI, M. & MANZANO, M. (2023), An Overview of the Use of Nanoparticles in Vaccine Development. Nanomaterials 12: 1828 (21 pp).

LUKAS, H., XU, C., YU, Y. & GAO, W. (2020), Emerging Telemedicine Tools for Remote COVID-19 Diagnosis, Monitoring and Management. ACS Nano 14 (12): 16180-16193.

LUO, Y., ZHOU, M., FAN, C., ..., WANG, L., XU, T. & ZHANG, X. (2023), Active Enrichment of Nanoparticles for Ultra-Trace Point-of-Care COVID-19 Detection. Analytical Chemistry 95(12): 5316-5322.

MABEY, D., PEELING, R.W., USTIANOWSKI, A. & PERKINS, M.D. (2004), Diagnostics for the Developing World. Nature Reviews Microbiology 2(3): 231-240.

MACINTYRE, C.R., LIM, S. & QUIGLEY, A. (2022), Preventing the Next Pandemic: Use of Artificial Intelligence for Epidemic Monitoring and Alerts. Cell Reports Medicine 3: 100867 (3 pp).

MADHURANTAKAM, S., MUTHUKUMAR, S. & PRASAD, S. (2022), Emerging Electrochemical Biosensing Trends for Rapid Diagnosis of COVID-19 Biomarkers as Point-of-Care Platforms: A Critical Review. ACS Omega 7(15): 12467-12483.

MAHASE, E. (2023), COVID-19: New «Pirola» Variant BA. 2.86 Continues to Spread in UK and US. BMJ 382: 2097.

MALHAIRE, H. & LAGARCE, F. (2015), Is Translational Approach Becoming a Reality in Nanomedicine? European Journal of Nanomedicine 7(2): 79-83.

MANDL, T., JAKI, S., MITERA, H. & SCHMIDT, F. (2023), Interdisciplinary Analysis of Science Communication on Social Media during the COVID-19 Crisis. Knowledge 3: 97-112 (16 pp).

MANÓCHIO, C., TORRES-LUREIRO, S., SCUDELER, M., MIWA, B., SOUZA-SANTOS, F.C. & RODRIGUEZ-SOARES, F. (2023), Theranostic for COVID-19 Antiviral Drugs: Prospects and Challenges for Worldwide Precision/Personalized Medicine. OMICS 27(1): 6-14.

MAO, P., LI, H. & YU, Z. (2023), A Review of Skin-Wearable Sensors for Non-Invasive Health Monitoring Applications. Sensors 23: 3673 (37 pp).

MAREFAT, A., MAREFAT, M., JOLOUDARI, J.H., NEMATOLLAHI, M.A. & LASHGARI, R. (2023), CCT-COVID: COCID-19 Detection from Chest X-Ray Images Using Compact Convolutional Transformers. Frontiers in Public Health 11: 1025746 (15 pp).

MARKOV, P.V., GHAFARI, M., BEER, M., LYTHGOE, K., SIMMONDI, P., STILIANAKIS, N.I. & KAZOURAKIS, A. (2023), The Evolution of SARS-CoV-2. Nature Reviews Microbiology 21(6): 361-379.

MARTIN, J., TENA, N. & ASUERO, A.G. (2021), Current State of Diagnostic, Screening, and Surveillance Testing Methods for COVID-19 from an Analytical Point of View. Microchemical Journal 167: 106305 (20 pp).

MARTÍN SÁNCHEZ, F.J., MARTÍNEZ-SELLÉS, M., MOLERO GARCÍA, J.M., ..., GONZÁLEZ DEL CASTILLO, J., MARTÍN-DELGADO, M.C. & BOUZA, E. (2022), Insights for COVID-19 in 2023. Revista Española de Quimioterapia 36(2): 114-124.

MAYER, M. & BAEUMNER, A.J. (2019), A Megatrend Challenging Analytical Chemistry: Biosensor and Chemosensor Concepts Ready for the Internet of Things. Chemical Reviews 119(13): 7996-8027.

MBUNGE, E., AKINNUWESI, B., FASHOTO, S.G., METFULA, A. & MASHWAMA, P. (2020), A Critical Review of Emerging Technologies for Tackling COVID-19 Pandemic. Human Behaviour & Emerging Technologies 3(1): 25-39.

MEDA, U.S., SOUNDARYA, V.G., MADHU, H. & CHAT, N. (2023), Nano-Engineered Textiles: Development and Applications. Materials Science and Engineering B 296: 116636 (20 pp).

MESKHER, H., MUSTANSAR, H.C., THAKUR, A.K., ..., SINGH, P., HAN, T.K. & SAIDUR, R. (2023), Recent Trends in Carbon Nanotubes (CNT)-Based Biosensors for the Fast and Sensitive Detection of Human Viruses: A Critical Review. Nanoscale Advances 5(4): 992-1010.

MEUMANN, E.M. & ROBSON, J.M.B. (2023), Testing for COVID-19: A 2023 Update. Australian Prescriber 46(1): 13-17.

MEZINA, A. & BURGET, R. (2024), Detection of Post-COVID-Related Pulmorary Diseases in X-Ray Images Using Vision-Transformed-Based Neural Network. Biomedical Signal Processing and Control 87: 105380 (11 pp).

MIMMI, S., ZIMBO, A.M., ROTUNDO, S., ..., QUINTO, I., TORTI, C. & IACCINO, E. (2023), SARS-CoV-2 Spike Protein-Guided Exosome Isolation Facilitates Detection of Potential miRNA Biomarkers in COVID-19 Infections. Clinical Chemical and Laboratory Medicine 61(8): 1518-1524.

MIN, J., TU, J., XU, C., LUKAS, H., SHIN, S., YANG, Y., SOLOMON, S.A., MUKASA, D. & GAO, W. (2023), Skin-Interfaced Wearable Sweat Sensors for Precision Medicine. Chemical Reviews 123(8): 5059-5138.

MINISTERIO DE SANIDAD (2023), Ponencia de alertas, planes de preparación y respuesta, La COVID-19 tras el fin de la emergencia sanitaria. Nuevo marco estratégico integrado en la vigilancia y control de las infecciones respiratorias agudas, 6 pp.

MISHRA, S., AANINA, B., PARIDA, S. & DAN, A.K. (2023), Carbon Based Biosensors: Next Generation Diagnostic Tool for Target-Specific Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19). Talanta Open 7: 100218 (10 pp).

MOGLIA, A., GEORGIOU, K., MARINOV, B., ..., BERCHIOLLI, R.N., SATAVA, R.M. & CUSCHIERI, A. (2022), 5G in Healthcare: From COVID-19 to Future Challenges. IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics 26(8): 4187-4196.

MOHAMMADI, M.H., MULDER, S., KHASHAYAR, P., KALBASI, A., AZIMZADEH, M. & AREF, A.R. (2021), Saliva Lab-on-a-Chip Biosensors: Recent Novel Ideas and Applications in Disease Detection. Microchemical Journal 168: 106506 (13 pp).

MOHIT, E., ROSTAMI, Z. & VAHIDI, H. (2021), A Comparative Review of Immunoassays for COVID-19 Detection. Expert Reviews in Clinical Immunology 17 (6): 537-599.

MOL, A. & HARDON, A. (2020), What COVID-19 May Teach Us about Interdisciplinarity. BMJ Global Health 5: e004375 (4 pp).

MORADIAN, N., OCHS, H.D., SEDIKIES, C., ..., HERRATH, M. VON, MOBAHSER, B. & REZAEI, N. (2020), The Urgent Need for Integrated Science to Fight COVI-19 Pandemic and Beyond. Journal of Translational Medicine 18: 205 (7 pp).

MORGAN, A.A., ABDI, J., SYED, M.A.Q., EL KOHEN, G., BARLOW, P. & VIZCAYCHIPI, M.P. (2022), Robots in Healthcare: A Scoping Review. Current Robotic Reports 3: 271-280.

MORIN, H. (2023), COVID-19: High Security Lab Construction Is Booming, Three Years after Virus Outbreak. Le Monde April 22 (leído 27 noviembre 2023).

MORLEY, A.A. (2014), Digital PCR: A Brief History. Biomolecules Detection and Quantification 1: 1-2.

MOSTAFAVI, E., DUBEY, A.K., TEODORI, L., RAMAKRISHNA, S. & KAUSHIK, A. (2022), SARS-CoV-2 Omicron Variant: A Next Phase of the COVID-19 Pandemic and a Call to Arms for System Sciences and Precision Medicine. MedComm 3(1): (8 pp).

MOTIEI, M., LUCIA, L.A., SÁHA, T. & SÁHA, P. (2023), Current State-of-the Art Review of Nanotechnology-Based Therapeutics for Viral Pandemics: Special Attention to COVID-19. Nanotechnology 12: 20220515 (25 pp).

MUSHIN, S.A., HE, Y., AL-AMIDIE, M., ..., GEORGE, H.S., WAN, X.-F. & ALMASHRI, M. (2023), A Microfluidic Sensor Architecture for the Rapid Detection of COVID-19. Analytica Chimica Acta 1275: 341378 (12 pp).

NADZIRAH, Sh., ZIN, N.M., KHALID, A., BAKAR, N.F.A., ..., ISMAIL, A.G., DEE, C.F. & HAMZAH, A.A. (2024), Detection of SARS-CoV-2 in Environment: Current Surveillance and Effective Data Management of COVID-19. Critical Reviews in Analytical Chemistry 54(8): 3083-3094.

NAFIAN, F., NAFIAN, S., AZAD, B.K.D. & HASHEMI, M. (2023), CRISP-Based Diagnostics and Microfluidics for COVID-19 Point of Care Testing: A Review of Main Applications. Molecular Biotechnology 65(4): 497-508.

NAIDOO, D.B. & CHUTURGOON, A.A. (2023), The Potential of Nanobodies for COVID-19 Diagnostics and Therapeutics. Molecular Diagnosis & Therapy 27(2): 193-226.

NAJAFABADI, Z.Y., FANNEL, S., FALAK, R., KABOLI, S. & KARDAR, G.A. (2023), The Trend of CRISP-Based Technologies in COVID-19 Disease: Beyond Genome Editing. Molecular Biotechnology 65(2): 146-161.

NAMIRAD, S., DEIRANLOU, M. & SAJADI, S.M. (2023), Exploring Factors Influencing the Adoption of Mobile Healthcare Technologies: Perspectives from Designers, Consultants and User's Preferences. American Journal of Business 38(3): 129-151.

NAN, X., YAO, X., YANG, L. & CUI, Y. (2023), Lateral Flow Assay of Pathogenic Viruses and Bacteria in Healthcare. Analyst 148(19): 4573-4590.

NASCIMENTO, E.D., FONSECA, W.T., DE OLIVEIRA, T.R., ..., POTT-JUNIOR, H., TEIXEIRA, H.F.R. & FARIA, R.C. (2022), COVID-19 Diagnosis by SARS-CoV-2 Spike Protein Detection in Saliva Using an Ultrasensitive Magneto-Assay Based on Disposable Electrochemical Sensor. Sensors & Actuators: B Chemical 353: 131128 (9 pp).

NASRALLA, M.M., KHATTAK, S.B.A., REHMAN, I. V. & IRBAL, M. (2023), Exploring the Role of 6G Technology in Enhancing Quality of Experience for m-Health Multimedia Applications: A Comprehensive Survey 23: 5582 (3 pp).

NAZIR, S. (2023), Medical Diagnostic Value of Digital PCR (dPCR): A Systematic Review. Biomedical Engineering Advances 6: 100092 (12 pp).

NELLIMARIA, S. & KESANAKURTI, P. (2023), Next Generation Sequencing: A Promising Tool for Vaccines and Other Biological Products. Vaccines (Basel) 11(3): 527 (3 pp).

NEMATOLLAHI, M.H., MOSTAFAVI, E. & IRAVANI, SE. (2023), Covalent Organic Frameworks and Metal Organic Frameworks against Pathogenic Viruses an Antibiotic-Resistant Bacteria: Diagnostic and Therapeutics Applications. Journal of Environmental Chemical Engineering 11: 109653 (13 pp).

NGUYEN, H., NGUYEN, H.L., DAN, P.D., THAI, N.Q., SIKORA, M. & LI, M.S. (2023), Interaction of SARSC-CoV-2 with Host Cells and Antibodies: Experiment and Simulation. Chemical Society Reviews 52(18): 6497-6553.

NIGG, C., PETERSEN, E. & MacINTYRE, T. (2023), Natural Environments, Psychosocial Health, and Health Behaviours in a Crisis – A Scoping Review of the Literature in the COVID-19 Context. Journal of Environmental Phycology 88: 102009 (85 pp).

NII-TREBI, N.I., MUGHOGHO, T.S., ABDULAI, A., TETTEH, F., OFOSU, P.M., OSEI, M.-M. & YALLEY, A.K. (2023), Dynamics of Viral Disease Outbreaks: A Hundred Years (1918/19-2019/20) in Retrospect – Loses, Lessons and Emerging Issues. Reviews in Medical Virology 33 (6): e2475 (13 pp).

NING, S., CHANG, H.-G., FAN, K.-C., ..., FENG, C., SCHOEMAKER, D. & CHEN, R.T. (2023), A Point-of-Care Biosensor for Rapid Detection and Differentiation of COVID-19 Virus (SARS-CoV-2) and Influenza Virus Using Subwavelength Grating Micro-Ring Resonator. Applied Physical Reviews 10(2): 021410.

OROZCO, J. (2023), Nanoscience, Nanotechnology, and Disruptive Technologies in the Context of Precision Medicine. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 47(183): 221-241.

ORTEGA, F. (2006), Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica, Real Academia Nacional de Farmacia (RANF): Madrid.

ORTEGA, F. (2010), Estrategias analíticas en la investigación de nuevos biomarcadores. En Biomarcadores: Analítica, Diagnóstico y Terapéutica, Realigraf S.A., Capítulo 1, pp. 13-54.

OZER, T. & HENRY, C.S. (2021), Paper-Based Analytical Devices for Virus Detection: Recent Strategies for Current and Future Pandemics. Trends in Analytical Chemistry 144: 116424 (16 pp).

PAL, S., BISWAS, B., GUPTA, R., KUMAR, A. & GUPTA, S. (2023), Exploring the Factors that Affect User Experience in Mobile-Health Applications: A Text-Mining and Machine-Learning Approach. Journal of Business Research 156: 113484 (15 pp).

PALANISAMY, S., LEE, L.-Y., KAO, C.-F., ..., JUAN, A.-S., KUNG, Y.-A. & WANG, Y.-M. (2023), One-Step-One-Pot Hydrothermally Derived Metal-Organic-Framework-Nanohybrids for Integrated Point of Care Diagnostics of SARS-CoV-2 Viral Antigen/Pseudovirus Utilizing Electrochemical Biosensor Chip. Sensors and Actuators B Chemical 290: 133960 (9 pp).

PANG, S., YU, H., ZHANG, Y., ..., WANG, M., ZHANG, H. & LIU, A. (2024), Bioscreening Specific Peptide-Expressing Phage and Its Application in Sensitive Dual-Mode Immunoassay of SARS-CoV-2 Spike Antigen. Talanta 266: 125093 (5 pp).

PARK, Y., RYU, B., KI, S.J., CHEN, M., LIANG, X. & KURABAYASHI, K.C. (2023), Bioinspired Plasmon Virus for Point of Care SARS-CoV-2 Detection. NanoLetters 23: 98-106.

PAPADOPOULOU, G., MANOLOUDI, E., REPOUSI, N., KOURA, L., HURST, T. & KARAMITROS, T. (2022), Molecular and Clinical Prognostic Biomarkers of COVID-19 Severity and Persistence. Pathogens 11: 311 (18 pp).

PARLAMENTO EUROPEO, P9_TA(2023)0282, Pandemia de COVID-19: enseñanzas extraídas y recomendaciones para el futuro. Resolución del Parlamento Europeo, de 12 de julio de 2023 (2022/2076[INI]).

PARUMS, D.V. (2023), Editorial: A Rapid Global Increase in COVID-19 Is Due to the Emergence of the EG.5 (Eris) Subvariant of Omicron SARS-CoV-2. Medical Science Monitor 29: e942244 (4 pp).

PATEL, S., SURVE, J., PARMAR, J., AHMED, K., BUI, F.M. & AL-ZAHRANI, F.A. (2023), Recent Advances in Biosensors for Detection of COVID-19 and Other Viruses. IEEE Reviews 16: 22-37.

PAWAR, A.A., PATWARDHAN, S.B., BARAGE, S., RAUT, R., LAKKAKULA, J., ROY, A., SHARMA, R. & ANAND, J. (2023), Smartphone-Based Diagnostic for Biosensing Infectious Human Pathogens. Progress in Biophysics and Molecular Biology 180-181: 120-130.

PEELING, R.W. & SIA, S.K. (2023), Lessons from COVID-19 for Improving Diagnostic Access in Future Pandemics. Lab on a Chip 23 (5): 1376 (13 pp).

PEI, F., FENG, S., HU, W., ..., CAO, Y., LEI, W. & TONG, Z. (2023), Sandwich Mode Lateral Flow Assay for

Point-of-Care Detecting SARS-CoV-2. Talanta 253: 124051 (20 pp).

PENG, H., FAN, H., HE, E.Z. & LI, J. (2023a), Recent Developments of Nanotechnology-Empowered Antigen Assay Methods for the Control of Infections Diseases. Analyst 148(13): 2892 (9 pp).

PENG, T., DONG, L., FENG, X., ..., DAI, X., LI, M. & FANG, X. (2023b), Relationship between SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and N Gene and Its Application in Antigen Testing Kits Evaluation. Talanta 258: 124462 (5 pp).

PERSSON, C.L., HÄGG, A.N. & SÖDERGARD, B. (2023), A Survey of Pharmacys't Perception of the Work Environment and Patient Safety in Community Pharmacies during the COVID-19 Pandemic. Exploratory Research in Clinical and Social Pharmacy 12: 100327 (11 pp).

PERVEEN, S., NEGI, A., GOPALAKRISHNAN, V., PANDA, S., SHARMA, V. & SHARMA, R. (2023), COVID-19 Diagnostics: Molecular Biology to Nanomaterials. Clinica Chimica Acta 538: 139-156.

PERVEZ, M.T., HASNAIN, M.J., ABBAS, S.J., MOUSTAFA, M.F., ASLAN, N. & SHAH, S.S.M. (2022), A Comprehensive Review of Performance of Next Generation Sequencing Platforms. Biomed Research International Article ID 3457806 (12 pp).

PIAGGIO, D., ZARRO, M., PAGLIARA, S., ..., ALMUHINI, A., MACCARO, A. & PECCHI, A.C. (2023), The Use of Smart Environments and Robots for Infection Prevention Control: A Systematic Literature Review. American Journal of Infection Control 51(10): 1175-1181.

PINHEIRO, T., CARDOSO, A.R., SOUSA, C.E.A., MARTINS, R., FORTUNATO, E. & SALES, M.G.F. (2021), Paper-Based Biosensors for COVID-19: A Review of Innovative Tools for Controlling the Pandemic. ACS Omega 6 (44): 29268-29290.

POLATOGLU, I., ONCU-ONER, T., DALMAN, I. & OZDOGAN, S. (2023), COVID-19 in Early 2023: Structure, Replication, Mechanism, Variants of SARS-CoV-2, Diagnostic Tests, and Vaccine & Drug Development Studies. MedComm 4(2): e228 (28 pp).

POLLET, K., GARNIER, N., SZUNERITS, S., MADDER, A., HOBER, D. & ENGELMANN, I. (2023), Host miRNAs as Biomarkers of SARS-CoV-2 Infection: A Critical Review. Sensing Diagnostics 2: 12 (24 pp).

POONGODI, M., HAMDI, M., MALVIYA, M., SHARMA, A., DHIMAN G. & VIMAL, S. (2022), Diagnosis and Combating COVID-19 Using Wearable Oura Smart Ring with Deep Learning Methods. Personal and Ubiquitous Computing 26(1): 25-35.

POPOVIC, M. (2023), The SARS-CoV-2 Hydra, a Tiny Monster from the 21st Century: Thermodynamics of the BA.5.2 and BF.7 Variants. Microbial Risk Analysis 23: 100249 (10 pp).

PRABHAKAR, P.K., KHURANA, N., VYAS, M., ..., SHARMA, N., KAUSHIK, A. & KUMAR, R. (2023), Aspects of Nanotechnology for COVID-19 Vaccines Development and Its Delivery Applications. Pharmaceutics 15: 451 (25 pp).

QIN, J., TIAN, X., LIU, S., ..., SHI, S., XU, S. & ZHANG, Y. (2024), Rapid Classification of SARS-CoV-2 Variant Strains Using Machine Learning-Based Label-Free SERS Strategy. Talanta 267: 125080 (9 pp).

QIN, J., WANG, W., GAO, L. & YAO, S.Q. (2022), Emerging Biosensing and Transducer Techniques for Potential Applications in Point-of-Care Diagnostics. Chemical Science 13(10): 2857 (20 pp).

QAHTAN, S., YATIM, K., ZULZALIL, H., OSMAN, M.H., ZAIDAN, A.A. & ALSATTAR, H.A. (2023), Review of Healthcare Industry 4.0 Application-Based Blockchain in Terms of Security and Privacy Development Attributes: Comprehensive Taxonomy, Open Issues and Challenges and Recommended Solution. Journal of Network and Computer Application 209: 103529 (22 pp).

QUER, G., RADIN, J.M., GADALETA, M., ..., KHETERPAL, V., TOPOL, E.J. & STEINHUBL, S.R. (2021), Wearable Sensor Data and Self-Reported Symptoms for COVID-19 Detection. Nature Medicine 27(1): 73-77.

RABADAN, R. (2020), Understanding Coronavirus, Cambridge University Press: Cambridge, U.K.

RABBANI, B., NAKAOKA, H., AKHONDZADEH, S., TEKIN, M. & MAHDIEH, N. (2016), Next Generation Sequencing: Implications in Personalized Medicine and Pharmacogenomic. Molecular Biosystems 12(6): 1818-1830.

RABIEE, N., FATAHI, Y., AHMADI, S., ..., MAKVANDI, P., LIMA, E.C. & SAEB, M.R. (2022), Bioactive Hybrid Metal-Organic Framework (MOF)-Based Nanosensors for Optical Detection of Recombinant SARS-CoV-2 Spike Antigen. Science of the Total Environment 825 (2022): 153902 (12 pp).

RAE, Diccionario de la Lengua Española, Real Academia Española (2021), https://dle.rae.es

RAMALINGAM, M., JAISANKAR, CHENG, L., ..., KIM, H.-W., SHI, Z. & MARRAZZA, G. (2023), Impact of Nanotechnology on Conventional and Artificial Intelligence-Based Biosensing Strategies for the Detection of Viruses. Discover Nano 18: 58 (28 pp).

RAO, P.M. & DEEBAK, B.D. (2023), A Comprehensive Survey on Authentication and Secure Key Management in Internet of Things: Challenges Countermeasures and Future Directions. Ad Hoc Networks 146: 103159 (31 pp).

RASMI, Y., KIRBOGA, K.K., KHAN, J., GUPTA, E., MOSTAFA, F., YALLUPU, M.M. & PILAQUINGA, F. (2023), Gold Nanoparticle-Based Strategies against SARS-CoV-2: A Review. Reviews on Advanced Materials Science 62(1): 20230105 (24 pp).

RAY, T.R., CHOI, J., BANDODKAR, A.J., ..., TIAN, L., GHAFFARI, R. & ROGERS, J.A. (2019), Bio-Integrated Wearable Systems: A Comprehensive Review. Chemical Reviews 119(8): 5461-5533.

RAZIQ, A., KIDAKOVA, A., BOROZNJAK, R., REUT, J., ÖPIK, A. & SYRITSKI, V. (2021), Development of a Portable MIP-Based Electrochemical Sensor for Detection of SARS-CoV-2 Antigen. Biosensors and Bioelectronics 178: 113029.

REHMAN, A., XING, H., KHAN, M.A., HUSSAIN, M., HUSSAIN, A. & GULZAR, N. (2023), Emerging Technologies for COVID (ET-CoV) Detection and Diagnosis: Recent Advancements, Applications, Challenges and Future Perspectives. Biomedical Signal Processing and Control 83: 104642 (20 pp).

REILLY, E. (2019), BSL-1, BSL-2, BSL-3 and BSL-4. What Are They? February 1, 2023.

REJEB, A., REJEB, K., APPOLLONI, A., JAGTAP, S., IRANMANESH, M., ALGHAMDI, S., ALHASAWI, Y. & KEYIKCI, Y. (2024), Unleashing the Power of Internet of Things and Blockchain: A Comprehensive Analysis and Future Directions. Internet of Things and Cyber-Physical Systems 4: 1-18.

REN, H., JIA, W., XIE, Y., YU, M. & CHEN, Y. (2023), Adjuvant Physicochemistry and Advanced Nanotechnology for Vaccine Development. Chemistry Society Reviews 52(15): 5172 (83 pp).

REPORT on the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned and Recommendations or the Future. Report-A9-0217/2023 European Parliament.

RINK, S. & BAEUMNER, A.J. (2023), Progression of Paper-Based Point-of-Care Testing toward Being an Indispensable Diagnostic Tool in Future Healthcare. Analytical Chemistry 95(3): 1785-1793.

RIOBOÓ-LEGASPI, P., GONZÁLEZ-LÓPEZ, A., BELTRÁN-SÁNCHEZ, J.F., ..., GARCÍA HARO, J., COSTA-RAMA, E. & FERNÁNDEZ-ABEDUL, M.T. (2024), Phenol Red as Electrochemical Indicator for Highly Sensitive Quantification of SARS-CoV-2 by Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection. Talanta 266: 124963 (8 pp).

ROBINSON, J. (2023), mRNA Vaccine Pioneers Win Medicine Nobel Prize. Chemistry World, October 2023.

ROCHA, D.S., BALDO, T.A., SILVA-NETO, H., ..., DE SIERVO, A., PAIXÃO, T.L.R.C. & COLTRO, W.K.T. (2024), Disposable and Eco-Friendly Electrochemical Immunosensor for Rapid Detection of SARS-CoV-2. Talanta 248: 125337 (9 pp).

ROQUENCOURT, C., SALVATOR, H., BARDIN, E., ..., VALINE, E., DEVILLIER, P. & GRASSIN-DEYLE, S. (2023), Enhanced Real-Time Mass Spectrometry Breath Analysis for the Diagnosis of COVID-19. ERJ Open Research 9(5): 00206-2023 (10 pp).

ROSS, G.M.S., ZHAO, Y., BOSMAN, A.J., GEBALLA-KOUKOULA, A., ZHOU, H., ELLIOT, C.T., NIELEN, M.W.F., RAFFERTY, K. & SALENTIJN, G.I.J. (2023), Best Practices and Current Implementation of Emerging Smartphone-Based (Bio)sensors – Part 1: Data Handling and Ethics. Trends in Analytical Chemistry 158: 116863 (20 pp).

RUIZ-BRAVO, A. & JIMENEZ-VALERA, M. (2020), SARS-CoV-2 y pandemia de síndrome respiratorio agudo (COVID-19). Ars Pharmaceutica 61(2): 63-79.

RUTJES, S.A., VENNIS, I.M., WAGNER, E., MAISAIA, V. & PEINTNER, L. (2023), Biosafety and Biosecurity Challenges during the COVID-19 Pandemic and Beyond. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 11: 1117316 (8 pp).

SAADI, J., OUESLATI, S., BELLANGER, L., ..., NAAS, T., FEINAILLE, F. & BECHER, F. (2021), Quantitative Assessment of SARS-CoV-2 Virus in Nasopharyngeal Swabs Stored in Transport Medium by a Straightforward LC-MS/MS Assay Targeting Nucleocapsid, Membrane, and Spike Proteins. Journal of Proteome Research 20 (2): 1434-1443.

SACH, J.D., KARIM, S.A., AKNIN, L., ..., KHANDELWAL, S., LAZAROUS, J.V. & MICHIE, S. (2022), The Lancet Commission on Lessons for the Future from the COVID-19 Pandemic. Lancet 400 (10359): 1224-1280.

SAFARI, I. & ELAMI, E. (2022), Evolution of SARS-CoV-2 Genome and Emergence of Variants of Concern. Archives of Virology 167: 293-305.

SALGADO FERNANDES, R., DE OLIVERA SILVA, J., BRAGA GOMES, K. BENTES AZEVEDO, R., TOWNSEND, D.M., DE PAULA SABINO, A. & BRANCO DE BARROS, L. (2022), Recent Advances in Point of Care Testing for COVID-19 Detection. Biomedicine & Pharmacotherapy 153: 113538 (14 pp).

SÁNCHEZ-BÁSCONES, E., PARRA, F. & LOBO-CASTAÑON, M.J. (2021), Aptamers against Viruses: Selection Strategies and Bioanalytical Applications. Trends in Analytical Chemistry 143: 116349 (22 pp).

SANDERSON, K. & CASTELVECCHI, D. (2023), Tiny 'Quantum Dot' Particles Win Chemistry Nobel. Nature 622 (7982): 227-228.

SANTIÑA, M. (2022), La tecnología 5G, una mirada desde la calidad asistencial. Journal of Healthcare Quality Research 35(6): 269-271.

SASMAL, B., HUSSIEN, A.G., DAS, A., DHAL, K.G. & SAHA, R. (2024), Reptile Search Algorithm: Theory, Variants, Applications, and Performance Evaluation. Archives of Computational Methods in Engineering 31: 521-549.

SATAM, H., JOSHI, K., MANGROLIA, U., ..., MISHRA, A.K., DAS, G. & MALONIA, S.K. (2023), Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. Biology 12: 997 (25 pp).

SAYGILI, S.K., SZYMANOWSKA, A., LÓPEZ-BERESTEIN, G., RODRÍGUEZ-AGUAYO, C. & AMERO, P. (2023), Aptamers as Insights for Targeting SARS-CoV-2. Biologics 3: 116-137 (22 pp).

SCHUSTER, O., ZVI, A., ROSEN, O., ..., YITZHAKI, S., LASKAR, O. & FELDBERG, L. (2021), Specific and Rapid SARS-CoV-2 Identification Based on LC-MS/MS Analysis. ACS Omega 6 (5): 3525-3534.

SEMIZ, S. (2022), COVID-19 Biomarkers: What Did We Learn from Systematic Reviews? Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 12: 1038908 (15 pp).

SENA-TORRALBA, A., ALVAREZ-DIDUK, P., PAROLO, C., PIPER, A. & MERKOÇI, A. (2022), Toward Next Generation Lateral Flow Assays: Integration of Nanomaterials. Chemical Reviews 122 (18): 14881-14910.

SEOK, Y., MAUK, M.G., LI, R. & QIAN, C. (2023), Trends of Respiratory Virus Detection in Point-of-Care Testing: A Review. Analytica Chimica Acta 1264: 341283 (16 pp).

SHAFAATI, M., CHORRA, H., PRIANKA, KHANDIA, R., CHOUDHARY, O.P. & RODRIGUEZ-MORALES, A.J. (2023), The Next Pandemic Catastrophe: Can We Avert the Inevitable? New Microbe and New Infect 52: 10110 (4 pp).

SHANG, M., GUO, J. & GUO, J. (2023), Point-of-Care Testing of Infectious Diseases: Recent Advances. Sensors & Diagnostics 2: 1123 (22 pp).

SHARMA, S., SHRIVASTAVA, S., KAUSLEY, S.B., RAI, B. & PANDIT, A.B. (2023), Coronavirus: A Comparative Analysis of Detection Technologies in the Wake of Emerging Materials. Infection 51: 1-19.

SHAUSAN, A., NAZARATHY, Y. & DYDA, A. (2023), Emerging Data Inputs for Infectious Diseases Surveillance and Decision Making. Frontiers in Digital Health 5: 1131731 (7 pp).

SHEN, Y., GUO, D., LONG, F., ..., CHEN, S., ZHANG, C. & TAN, H. (2021), Robots under COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Survey. IEEE Access 9: 1590-1615.

SHETA, S.M. & EL-SHEIKH, S.M. (2022), Nanomaterials and Metal-Organic Frameworks for Biosensing Applications of Mutations of the Emerging Viruses. Analytical Biochemistry 648: 114680 (17 pp).

SHI, B., LIU, Z., ZHENG, Q., ..., FAN, Y., WANG, Z.L. & LI, Z. (2019), Body-Integrated Self-Powered System for Wearable and Implantable Applications. ACS Nano 13 (5): 6017: 6024.

SHI, Q., YANG, Y., SUN, Z. & LEE, C. (2022), Progress of Advanced Devices and Internet of Things Systems as Enabling Technologies for Smart Homes and Health Care. ACS Materials Au 2(4): 394-435.

SIKANDER, S., BISWAR, P. & KULLARNI, P. (2023), Recent Advances in Telemedicine: Surgical, Diagnostic and Consultation Services. Biomedical Engineering 6: 100096 (15 pp).

SILVESTRE, A., ZAYAS-ARRABAL, J., VERA-HIDALGO, M., ..., PRATO, M., COLUZZA, I. & CRIADO, A. (2023), Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein by Graphene Field-Effect Transistors. Nanoscale 15(3): 1076-1085.

SING, C.K. & SODHI, K.K. (2023), The Emerging Significance of Nanomedicine-Based Approaches to Fighting COVID-19 Variants of Concern: A Perspective on the Nanotechnology's Role in COVID-19 Diagnosis and Treatment. Frontiers in Nanotechnology 4: 1084033 (13 pp).

SINGHAL, A., PARIHAR, A., KUMAR, N. & KHAN, R. (2022), High Throughput Molecularly Imprinted Polymers Based Electrochemical Nanosensors for Point-of-Care Diagnostics of COVID-19. Material Letters 306: 130898 (5 pp).

SINGLA, P., KAUR, H., GARG, S., KAUR, N., CANFAROTTA, F., MAHAJAN, R.K. & PEETERS, M. (2023), Early Detection of SARS-CoV-2 with Functionalized Gold and Molecularly Imprinted Polymeric Nanoparticles: A Mini Review. Molecular Systems Design & Engineering 8(11): 1337-1354.

SMAIL, S.W., BABAEI, E. & AMIN, K. (2023), Hematological, Inflammatory, Coagulation, and Oxidative/Antioxidant Biomarkers as Predictors for Severity and Mortality in COVID-19: A Prospective Cohort-Study. International Journal of General Medicine 16: 565-580.

SOHAIL, M., XIE, S., ZHANG, X. & LI, B. (2022), Methodologies in Visualizing the Activation of CRISP/Cas: The Last in Developing CRISP-Based Diagnostics and Biosensing – A review. Analytica Chimica Acta 1205: 339541.

SOLANKI, R., SHANKIAR, A., MODI, U. & PAREL, S. (2023), New Insights from Nanotechnology in SARS-CoV-2 Detection, Treatment Strategy, and Prevention. Materials Today Chemistry 29: 101478 (18 pp).

SONG, Q., SUN, X., DAI, Z., ..., ZHOU, B., WU, J. & WEN, W. (2021a). Point-of-Care Testing Detection Methods for COVID-19. Lab on a Chip 21(9): 1634-1660.

SONG, Y., MUKASA, D., ZHANG, H. & GAO, W. (2021b), Self-Powered Wearable Biosensors. Accounts of Materials Research 2 (3): 184-197.

SOOD, D.K., RAWAT, K.S. & KUMAR, D. (2022), A Visual Review of Artificial Intelligence and Industry 4.0 in Healthcare. Computers and Electrical Engineering 101: 107948 (15 pp).

SPICUZZA, L., CAMPAGNA, D., DI MARIA, C., ..., MANCUSO, S., VANCHERI, C. & SAMBATARO, C. (2023), An Update on Lateral Flow Immunoassay for the Rapid Detection of SARS-CoV-2 Antibodies. AIMS Microbiology 9(2): 375-401 (27 pp).

STENSETH, N.C., DHARMARAJAN, G., LI, R., SHI, Z.-L., YANG, R. & GARO, G.F. (2021), Lessons Learnt from the COVID-19 Pandemic. Frontiers in Public Health 9: Article 694705 (6 pp).

SOTO, J., LINSLEY, C., SONG, Y., ..., LEE, B., WU, B. & LI, S. (2023), Engineering Materials and Devices for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of COVID-19 and Infectious Diseases. Nanomaterials 13: 2455 (35 pp).

SRITONG, N., DE MEDEIROS, M.S., BASING, K.A. & LINNERS, J.C. (2023), Promise and Perils of Paper-Based Point of Care Nucleic Acid Detection for Endemic and Pandemic Pathogens. Lab on a Chip 33(5): 888-912.

SRIVASTAVA, K., WEST, K.A., GIORGI, V.D., ..., BOVIN, N.V., HENRY, S.M. & FLEGEL, W.A. (2021), COVID-19 Antibody Detection and Assay Performance Using Red Cell Agglutination. Microbiology Spectrum 9 (3) e00830 (21 pp).

SUÁREZ-VERGNE, A. & TARDIVO, G. (2023), Estigma y COVID-19. Lecciones aprendidas e intuiciones de cara al futuro. ARBOR 199 (808): 1-11.

SUBRAMANIAM, K., PALANISAMY, N., SINNASWAMY, R.A., ..., GNANAKKAN, C.A.R.C., THANGAVEL, G. & SUNDARAJAN, S.C.M. (2023), A Comprehensive Review of Analyzing the Chest X-Ray Images to Detect COVID-19 Infections Using Deep Learning Techniques. Soft Computing 27: 14219-14240.

SUCRE, A., AMAYA-RODRIGUEZ, I., RHO, H.-S., SERNA, S., REICHARDT, N., GAXIN-MUGA, A. & EPEDLDE, G. (2022), COVID-BIOCHIP: A WEB Tool to Analyse COVID-19 Antigen Microarrays. En Advances in Informatics, Management and Technologies in Healthcare, J. MANTAS *et al.* (eds.), Studies in Health Technology and Informatics Series, Vol. 295, pp 183-186, IOS Press.

SULEIMAN, T.A. & ADINOYI, A. (2023), Telemedicine and Smart Healthcare – The Role of Artificial Intelligence, 5 G, Cloud Services, and Other Enabling Technologies. International Journal of Communications Network and System Sciences 16: 31-51.

SULLIVAN, M.V., ALLABUSH, F., FLYNN, H., ..., MENDES, P.M., TUCKER, J.H.R. & TURNER, N.W. (2023), Highly Selective Aptamer Molecular Imprinted Polymer Hybrids for Recognition of SARS-CoV-2 Spike Protein Variants. Global Challenges 7: 2200215 (11 pp).

SUN, A., NING, Q., LI, T., ..., TANG, N., CUI, D. & WANG, K. (2023), Immunochromatographic Enhancement Strategy for SARS-CoV-2 Detection Based on Nanotechnology. Nanoscale 15(37): 15092-15107.

SUNDEEP, D., VARADHARAJ, E.K., UMADEVI, K. & JHANSI, R. (2023), Review – Role of Nanomaterials in Screenprinted Electrochemical Biosensors for Detection of COVID-19 and for Post-Covid Syndromes. ECS Advances 2: 016502 (13 pp).

SWEET, D.R., FREEMAN, M.L. & ZIDAR, D.A. (2023), Immunohematologic Biomarkers in COVID-19: Insights into Pathogenesis, Prognosis, and Prevention. Pathogens and Immunity 8(1): 17-50.

SZUNERITS, S., RODRIGUES, T., BAGALE, R., HAPPY, H., BOUKHERROUB, R. & KNOLL, W. (2024), Graphene-Based Field-Effect Transistors for Biosensing: Where Is the Field Heading to? Analytical and Bioanalytical Chemistry 416(9): 2137-2150.

TAHA, B.A., AL-JUBOURI, Q., CHAHAL, S., ..., RUSTAGI, S., CHAUDHARY, V. & ARSAD, N. (2024), State-of-the-Art Telemodule-Enabled Intelligent Optical Nano-Biosensors for Proficient SARS-CoV-2 Monitoring. Microchemical Journal 197: 109774 (19 pp).

TAN, C., WANG, N., DENG, S., ..., YUE, C., JIA, X. & LYU, Y. (2023), The Development and Application of Pseudoviruses: Assessment of SARS-CoV-2 Pseudoviruses. PeerJ 11: e16234 (17 pp).

TARIM, E.A., INEVI, M.A., OZKAN, I., ..., OZCIVICI, E., KARAKUS, C.O. & TEKIN, H.C. (2023), Microfluidic-Based Techniques for Diagnosis, Prevention and Treatment of COVID-19: Recent Advances and Future Directions. Biomedical microdevices 15: 10 (25 pp).

TENG, R., DING, Y. & SEE, K.C. (2022), Use of Robots in Critical Care: Systematic Review. Journal of Medical Internet Research 24(5): e33380.

TESSARO, L., AQUINO, A., PANZENHAGEN, JOSHI, N. & CONTE-JUNIOR, C.A. (2023), A Systematic Review of the Advancement on Colorimetric Nanobiosensors for SARS-CoV-2 Detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 22: 115087 (10 pp).

THAPA, S., BELLO, A., MAURUSHAT, A. & FARID, F. (2023), Security Risks and User Perception towards Adopting Wearable Internet of Medical Things. International Journal of Environmental Research and Public Health 20: 5519 (22 pp).

THOMAS, M.J., LAL, V., BABY, A.K., RAVEEH VP, M., JAME, A. & RAJ, A.K. (2021), Can Technological Advancements Help to Alleviate COVID-19 Pandemic? A Review. Journal of Biomedical Informatics 117: 103787 (22 pp).

TIAN, T. & ZHOU, X. (2023), CRISP-Based Biosensing Strategies: Technical Development and Application Prospects. Annual Review in Analytical Chemistry 16: 311-332.

TOMICHAN, R., SHARMA, A., AKASH, K., ..., KUMAR, D., PANDEY, S. & NAGRAIK, R. (2023), Insight of Smart Biosensors for COVID-19: A Review. Luminiscence 38(7): 1102-1110.

TSILINGIRIS, D., VALLIANOU, N.G., KARAMPELA, I., ..., PETROPOULOU, D., MAGKOS, F. & DALAMAGA, M. (2023), Laboratory Findings and Biomarkers in Long COVID: What Do We Know so Far? Insights into Epidemiology, Pathogenesis, Therapeutics Perspective and Challenges. International Journal of Molecular Sciences 24: 10458 (46 pp).

TUISKU, O., PARJANEN, S., HYYPICI, M. & PEKKARINEN, S. (2024), Managing Changes in the Environment of Human Robot Interaction and Welfare Services. Information Technology and Management 25: 1-18.

TYAGI, A., NIGAM, S. & CHAUCHAN, R.S. (2020), A Concise Review of Baseline Facts of SARS-CoV-2 for Interdisciplinary Research. ChemistrySelect 5 (35): 10897-10923.

UDOURIOH, G.A., SOLOMON, M.M. & EPELLE, E.I. (2021), Metal Organic Frameworks as Biosensing Materials for COVID-19. Cellular and Molecular Bioengineering 14(6): 535-553.

UDUGAMA, B., KADHIRESAN, P., KOZLOWSKI, H.N., MALEKJAHANI, A., OSBORNE, M., LI, V.Y.C., CHEN, H., MUBAREKA, S., GUBBAY, J.B. & CHAN, W.C.W. (2020), Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. ACS Nano 14 (4): 3822-3835.

UMAIR, M., CHEEMA, M.A., CHEEMA, O., LI, H. & LU, H. (2021), Impact of COVID-19 on IoT Adoption in Healthcare, Smart Homes, Smart Buildings, Smart Cities, Transportation and Industrial IoT. Sensors 21: 3838 (33 pp).

USHCOA (2023), Hearing Wrap Up: High Risk Laboratories Need Updated Biosafety and Biosecurity Standards, COVID-19 Exacerbated Short Comings, United States House Committee on Oversight and Accountability, Published Oct 18.

VALERA, E., JANKELOW, A., LIM, J., KINDRATENKO, V., GANDULI, A., WHITE, K., KUMAR, J. & BASHIR, R. (2021), COVID-19 Point-of-Care Diagnostics: Present and Future. ACS Nano 15 (5): 7899-7906.

VALIPOUR, M., IRANNJEAD, H. & KEYVANI, H. (2023), An Overview on Anti-COVID-19 Drug Achievements and Challenges Ahead. ACS Pharmacology & Translational Science 6: 1248-1265.

VÁSQUEZ, V. & OROZCO, J. (2023), Detection of COVID-19-Related Biomarkers by Electrochemical Biosensor and Potential for Diagnosis, Prognosis, and Prediction of the Course of the Disease in the Context of Personalized Medicine. Analytical and Bioanalytical Chemistry 415: 1003-1031.

VILLADIEGO, J., GARCIA-ARRIAZA, J., RAMIREZ-LORCA, R., ..., ESTEBAN, M., LOPEZ-BARNEO, J. & TOLEDO-ARAL, J.J. (2023), Full Protection from SARS-CoV-2 Grain Infection and Damage in Susceptible Transgenic Mice Conferred by MVA-CoV-2 Vaccine Candidate. Nature Neuroscience 26: 226-238.

VINDEIRINHO, J.M., PINHO, E., AZEVEDO, N.F. & ALMEIDA, C. (2022), SARS-CoV-2 Diagnostics Based on Nucleic Acids Amplification: From Fundamental Concepts to Applications and Beyond. Frontiers in Cell and Infection Microbiology 12: 799678 (29 pp).

VLASOVA-ST. LOUIS, I., FANG, D., AMER, Y. & MOHEI, H. (2023), COVID-19-Omics Report: From Individual Omics Approaches to Precision Medicine. Reports 6: 45 (25 pp).

WACHARAPLUEDADEE, S., HIRUNPATRAWONG, P., PERCHARAT, S., ..., JONES, A.R., FERNANDEZ, S. & PUTCHAROEN, O. (2023), Simultaneous Detection of Omicron and Other SARS-CoV-2 Variants by Multiplex PSR Mass ARRAY Technology. Scientific Reports 23: 2089 (11 pp).

WALKER, M., PHUNG, T., CHAKRABORTI, T., WILLIAMS, T. & SZAFER, D. (2023), Virtual, Augmented, and Mixed Reality for Human-Robot Interactions: A Survey and Virtual Design Element Taxonomy. ACM Transactions Human-Robot Interaction 12(4): Art. 43 (39 pp).

WANDT, KE, T., WEDROWSKA, E., SZCZUR, M., PRZYBYLSKI, G., LIBURA, M. & KOPINSKI, P. (2022), Aptamers – Diagnostic and Therapeutic Solution in SARS-CoV-2. International Journal of Molecular Sciences 23 (3): 1412 (28 pp).

WANG, B., ZHOU, S., JIANG, S., QUIN, S. & GAO, B. (2023a), Personalized Medical Devices Convert Monitoring and Assistance: Emerging Wearable Soft Robots. Analytical Chemistry 95 (22): 8395-8410.

WANG, J., XIE, Q., SONG, H., ..., LI, N., FAN, K. & WANG, X. (2023b), Utilizing Nanozymes for Combating COVID-19: Advancements in Diagnostics, Treatments, and Preventative Measures. Journal of Nanobiotechnology 21: 200 (16 pp).

WANG, J., XU, X. & KOTSIFAKI, D.G. (2023c), Plasmonic and Metamaterial Biosensors: A Game-Changer for Virus Detection. Sensors & Diagnostics 2: 600-619.

WANG, L., PAGETT, M. & ZHANG, W. (2023d), Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Based Electrochemical Sensors and Their Recent Advances in Health Applications. Sensors and Actuator Reports: 5: 100153 (10 pp).

WANG, Q., PANPRADISTI, N., KOTNIK, J.H., ..., LIU, J.K., LUTZ, B.R. & LAI, J.J. (2023e), A Simple Agglutination System for Rapid Antigen Detection from Large Sample Volumes with Enhanced Sensitivity. Analytica Chimica Acta 1277: 341674.

WANG, R., HONGHAO, Lv., LU, Z., HANG, X, WU, H., JUNJIE, X. & YANG, G. (2023f), A Medical Assistive Robot for Telehealth Care during the COVID-19 Pandemic: Development and Usability Study in an Isolated Ward. JMIR. Human Factors 10: e42780 (13 pp).

WANG, W., KANG, S., ZHOU, W. & VIKESLAND, P.J. (2023g), Environmental Routes of Virus Transmission and the Application of Nanomaterial-Based Sensors for Virus Detection. Environmental Science: Nano 10(2): 393-423.

WANG, X., CLAVIER, G., ZHANG, Y., ..., DING, B., TISSOT, A. & SERRE, C. (2023h), A MOF/DNA Luminescent Sensing Platform for Detection of Potential COVID-19 Biomarkers and Drugs. Chemical Science 14(20): 5386-5395.

WANG, X.V. & WANG, L. (2021), A Literature Survey of the Robotic Technologies during the COVID-19 Pandemic. Journal of Manufacturing Systems 60: 823-836.

WHO (2023), World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants; https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants

WIBOWO, Y.G., RAMADAN, B.S., TAHER, T. & KHAIRURRIJAL, K., Advancements of Nanotechnology and Nanomaterials in Environmental and Human Protection for Combatting the COVID-19 during and Post-Pandemic Era: A Comprehensive Scientific Review. Biomedical Materials & Devices 10: 1-24.

WILLIAMS, B.A., JONES, C.H., WELCH, V. & TRUE, J.M. (2023), Outlook of Pandemic Preparedness in a Post-COVID-19 World. Npj Vaccines 8: 178 (12 pp).

WILNER, O.I., YESODI, D. & WEIZMANN, Y. (2023), Point-of-Care Nucleic Acid Tests: Assays and Devices. Nanoscale 15: 942-952.

WONG, T.F., SO, P.-K. & YAO, Z-P. (2022), Advances in Rapid Detection of SARS-CoV-2 by Mass Spectrometry. Trends in Analytical Chemistry 157: 116759 (8 pp).

WOODWARD, K., BRADBY, H., JASSO, G. & CHEUNG, S.Y. (2022), Editorial: Lessons from COVID-19: Building a Farer, Healthier, Inclusive, and Sustainable Post-Pandemic Society. Frontiers in Sociology 7: 1100563 (2 pp).

WÖRNER, T.P., SHAMORKINA, T.M., SNIJDER, J. & HECK, A.J.R. (2021), Mass Spectrometry-Based Structural Virology. Analytical Chemistry 93 (1): 620-640.

WU, Y., YU, Q., JOUNG, Y., ..., JOO, S.-W., CHEN, L. & CHOO, J. (2023), Highly Uniform Self-Assembly of Gold Nanoparticles by Butanol-Induced Dehydration and Its SERS Applications in SARS-CoV-2 Detection. Analytical Chemistry 95(34): 1270-1278.

WULFF, G. (2023), Forty Years of Molecular Imprinting in Synthetic Polymers: Origin, Features and Perspectives. Microchimica Acta 180: 1359-1370.

XANG, D., KUKLAR, D. & KIM, K.-H. (2023), Immunological Tests: Essential and Supportive Tools in the Fight against COVID-19. Trends in Analytical Chemistry 168: 117291 (15 pp).

XIANG, A., LI., L., WU, J., TIAN, M. & FU, Y. (2022), Application of Pseudovirus System in the Development of Vaccine, Antiviral-Drugs and Neutralizing Antibodies. Microbiological Research 258: 126993 (10 pp).

XIAO, H., HU, J., HUANG, C., XU, J., LE, X.C. & ZHANG, H. (2023), CRISP Techniques and Potential for the Detection and Discrimination of SARS-CoV-2 Variants of Concern. Trends in Analytical Chemistry 161: 117000 (17 pp).

XIE, L., ZHANG, Z., WU, Q., GAO, Z., MI, G., WANG, R., SUN, H-B., ZHAO, Y. & DU, Y. (2023), Intelligent Wearable Devices Based on Nanomaterials and Nanostructures for Healthcare. Nanoscale 15(2): 405-433.

XU, D., ZHANG, W., LI, H., LI, N. & LIN, J.-M. (2023), Advances in Droplet Digital Polymerase Chain Reaction on Microfluidic Chips. Lab on a Chip 23(5): 1258-1278.

XU, M., LI, Y., LIN, C., ..., ZHAO, S., YANG, X. & YANG, Y. (2022), Recent Advances of Representative Optical Biosensors for Rapid and Sensitive Diagnostics of SARS-CoV-2. Biosensors 12: 862 (27 pp).

XU, M., WANG, D., WANG, H., ..., ZHANG, K., XU, D. & YU, X. (2020), COVID-19 Diagnostic Testing: Technology Perspective. Clinical and Translational Medicine 10: e158 (15 pp).

XUE, J., CHEN, F., BAI, M., CAO, X., FU, W., AHANG, J. & ZHO, Y. (2021), Aptamer-Functionalized Microdevices for Bioanalysis. ACS Applied Materials Interfaces 13 (8): 9402-9411.

YADAV, A.K., VERMA, D., KUMAR, A., KUMAR, P. & SOLANKI, P.R. (2021), The Perspectives of Biomarker-Based Electrochemical Immunosensors, Artificial Intelligence and the Internet of Medical Things toward COVID-19 Diagnosis and Management. Materials Today Chemistry 20: 100443 (19 pp).

YADAV, S.K., VERMA, D., YADAV, U., ..., PRIYADARSHINI, N., KUMAR, A. & MAHATO, K. (2023), Point-of-Care Devices for Viral Detection: COVID-19 Pandemic and Beyond. Micromachines 14: 1744 (25 pp).

YAKOUBI, A. & DITAFER, C.E.B. (2023), Advanced Plasmonic Nanoparticle-Based Techniques for the Prevention, Detection and Treatment of Current COVID-19. Plasmonic 18: 311-347.

YANG, D.-M., CHANG, T.-J., HUNG, K.-F., ..., LIAO, Y.-T., LAI, W.Q. & LIANG, K-H. (2023a), Smart Healthcare: A Prospective Future Medical Approach for COVID-19. Journal of Chinese Medical Association 86: 138-146.

YANG, L.F., LING, M., KARCHEGOVSKY, N. & PUN, S.H. (2023b), Aptamers 101: Aptamer Discovery and In Vitro Applications in Biosensors and Separations. Chemical Science 14(19): 4961-4978.

YANG, Y., WANG, H., JIANG, R., GUO, X, CHENG, J. & CHEN, Y. (2022), A Review of IoT-Enabled Mobile Healthcare: Technologies, Challenges, and Future Trends. IEEE Internet of Things Journal 9(12): 9478-9502.

YANG, R., ZHAO, L., WANG, X., KONG, W. & LUAN, Y. (2023c), Recent Progress in Aptamer and CRISP-Cas 12a Based Systems for Non Nucleic Target Detection. Critical Reviews in Analytical Chemistry (18 pp) ahead of print.

YANG, Z.-W., LI, J.-J., WANG, Y.-H., ..., LIU, Y., WANG, H.-S. & DING, Y. (2023d), Metal/Covalent-Organic Framework-Based Biosensors for Nucleic Acid Detection. Coordination Chemistry Reviews 491: 215249 (21 pp).

YAO, B., SUN, D., REN, Y. & WANG, M. (2022), Introducing Theoretical Principles of Semi-, Relative-, and Absolute Quantification via Conventional, Real-Time, and Digital PCR Graduate and Senior Undergraduate Students of Chemistry. Journal of Chemical Education 99 (2): 603-611.

YARI, P., LIANG, S., CHUG, V.K., ..., WANG, J.-P., GÓMEZ-PASTORA, J. & WU, K. (2023), Nanomaterial-Based Biosensors for SARS-CoV-2 and Future Epidemics. Analytical Chemistry 95(42): 15419-15449.

YARMAN, A. & KURBANOGLU, S. (2022), Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for SARS-CoV-2: Where Are We Now? Biomimetics 7: 58 (17 pp).

YE, Z., HARMON, J., NI, W., LI, Y., WICH, D. & XU, Q. (2023), The mRNA Vaccine Revolution: COVID-19 Has Launched the Future of Vaccinology. ACS Nano 17(16): 15231-15233.

YODSIN, N., SRIPHUMRAT, K., MANO, P., KONGPATPANICH, K. & NAMUANGRUK, S. (2022), Microporous and Mesoporous Materials 343: 112187 (10 pp).

YOSHINARI, T., HAYASHI, K., HIROSE, S., ..., SAITO, Y., GODA, Y. & HARA-KUDO, Y. (2022), Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis for the Direct Detection of SARS-CoV-2 in Nasopharyngeal Swabs. Analytical Chemistry 94: 4218-4226.

YU, W., DRZYMALLA, E., GWINN, M. & KHOURY, M.J. (2023a), COVID-19 GPH: Tracking the Contribution of Genomics and Precision Health to the COVID-19 Pandemic Response. BMC Infectious Diseases 22: 402 (11 pp).

YU, X., PAN, B., ZHAO, C., ..., SUN, G., LIU, R. & LAM, K.S. (2023b), Discovery of Peptidic Ligands against the SARS-CoV-2 Spike Protein and Their Use in the Development of a Highly Sensitive Personal Use Colorimetric COVID-19 Biosensor. ACS Sensors 8 (6): 2159-2168.

ZAFAR, N. & AHAMED, J. (2022), Emerging Technologies for the Management of COVID-19: A Review. Sustainable Operations and Computers 3: 249-257.

ZAYED, B.A., ALI, A.N., ELGEBALI, A.A., TALAIA, N.M., HAMED, M. & MANSOUR, F.R. (2023), Smartphone-Based Point-of-Care Testing of the SARS-CoV-2: A Systematic Review. Scientific African 21: e01757 (23 pp).

ZEMMAR, A., LOZANO, A.M. & NELSON, B.J. (2020), The Rise of Robots in Surgical Environments during COVID-19. Nature Machine Intelligence 2: 566-572.

ZHANG, D., KUKKAR, D. & KIM, K.-H. (2023), Immunological Tests: Essential and Supportive Tools in the Fight against COVID-19. Trends in Analytical Chemistry 168: 117291 (15 pp).

ZHANG, L. & GUO, H. (2020), Biomarkers of COVID-19 and Technologies to Combat SARS-CoV-2. Advances in Biomarkers Sciences Technology 2: 1-23.

ZHANG, Y. & LI, Y. (2023), Clinical Translation of Aptamers for COVID-19. Journal of Medicinal Chemistry 66(24): 16658-16578.

ZHAO, J., ZHANG, S., ZHOU, N., YU, H., ZHANG, H. & JIA, D. (2022a), Wearable Optical Sensing in the Medical Internet of Things (MIoT) for Pervasive Medicine: Opportunities and Challenges. ACS Photonics 9(8): 2579-2599.

ZHAO, Y., XUE, Q., WANG, M., JIANG, Y., ZHAI, R., ZHANG, Y., DAI, X. & FANG. X. (2023a), Evolution of Mass Spectrometry Instruments and Techniques for Blood Proteomics. Journal of Proteome Research 22(4): 1009-1023.

ZHAO, Z., MA, Y., MUSHTAQ, A., ..., SONG, W., REN, H. & TSE, Z.T.H. (2022b), Applications of Robotics, Artificial Intelligence, and Digital Technologies during COVID-19. A review. Disaster Medicine and Public Health Preparedness 18(16): 1634-1644.

ZHAO, Z., SUN, L., WANG, L., LI, X. & PENG, J. (2023b), A Multiplex Method for Detection of SARS-CoV-2 Variants Based on MALDI-TOF Mass Spectrometry. Biosafety and Health 5(2): 101-107.

ZHAO, Z., YANG, Z., NIU, R., ..., LIN, P., GUAN, H. & MENG, L. (2023c), ML-101 (Cu Fe) Nanozymes with Excellent Peroxidase-Like Activity for Simple, Accurate, and Visual Nake-Eye Detection of SARS-CoV-2. Analytical Chemistry 95: 1731-1738.

ZHOU, D-W., WANG, K., ZHANG, Y-A., YU, S-S., CHEN, K-Z. & QUIAO, S-L. (2023a), mRNA Therapeutics for Disease Therapy: Principles, Delivery, and Clinical Translation. Journal of Materials Chemistry B 11(16): 3484 (27 pp).

ZHOU, T., LIU, F., LU, H., PENG, C. & YE, X. (2023b), A Review of Deep Learning Imaging Diagnostics Methods for COVID-19. Electronics 12: 1167 (22 pp).

ZHOU, W., SUI, Z., LIU, J., ..., YANG, K., ZHANG, L. & ZHANG, Y. (2023c), High-Sensitivity Detection toward SARS-CoV-2 S1 Glycoprotein by Parallel Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Analytical Chemistry 95: 8752-8757.

ZHOU, Y. (2021), Material Foundation for Future 5G Technology. Accounts of Materials Research 2(5): 306-310.

ZOVKO, K., SERIC, L., PERKOVIC, T., BELANI, H. & SOLIC, P. (2023), IoT and Health Monitoring Wearable Devices as Enabling Technologies for Sustainable Enhancement of Life Quality in Smart Environments. Journal of Cleaner Production 413: 137506 (12 pp).

ZULIANI, A., KHIAR, N. & CARRILO-CARRIÓN, C. (2023), Recent Progress of Metal-Organic Frameworks as Sensors in (Bio)analytical Fields: towards Real-World Applications. Analytical and Bioanalytical Chemistry 415: 2025-2023.

Capítulo XVIII

Aspectos bioquímicos relacionados con la patogenicidad del coronavirus SARS-CoV-2

Cristina Garzón-Rodriguez[1], Antonio Ayala[2], Ana Gómez[3] y Mario F. Muñoz[2]
[1] *Servicio de Geriatría del Hospital San Juan de Dios-Eduardo Dato, Sevilla.*
[2] *Académico correspondiente de la Academia Iberoamericana de Farmacia. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla.*
[3] *Departamento de Fisiología, Universidad de Sevilla.*

INTRODUCCIÓN

El **síndrome respiratorio agudo grave** (SARS, por sus siglas en inglés: severe acute respiratory syndrome) es una enfermedad respiratoria viral descrita por primera vez en 2003, causada por un coronavirus que se denominó **SARS-CoV** (coronavirus asociado al SARS). La enfermedad tuvo su origen en China y se propagó rápidamente a varios países, aunque el brote global fue contenido y desde 2004 no se han reportado nuevos casos de SARS.

En 2012, se describió en Oriente Medio una enfermedad causada por un virus relacionado que, por el lugar de aparición y la patología producida, se denominó **MERS-CoV** (virus causante del síndrome respiratorio del Oriente Medio). Dicho virus compartía con el SARS-CoV el 80 % de su genoma. En este caso, las personas enfermaron por contacto directo o indirecto con dromedarios infectados en varios países (Arabia Saudita, Egipto, Omán y Qatar). En realidad, existe muy poca información sobre su transmisión, gravedad e impacto clínico, y solo unos pocos casos han sido notificados hasta el momento (unas 2.500 personas) con una tasa de letalidad del 34,5 %.

A finales del año 2019 se produjo un nuevo brote epidémico de neumonía de causa desconocida en Wuhan, provincia de Hubei, China, descartándose que el causante fuera el SARS-CoV, ni otro virus responsable de enfermedades respiratorias conocidas (Zhu *et al.* 2020)

En febrero de 2020, la OMS asignó como nombre oficial de la enfermedad **COVID-19** (acrónimo de «coronavirus disease 2019»; «enfermedad por coronavirus 2019», en español) evitando así que la denominación hiciera referencia a ningún lugar o colectivo. En esta misma fecha, el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) decidió que el nombre del nuevo virus fuese «**coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2)**» ya que, aun siendo diferente, el virus estaba genéticamente relacionado con el coronavirus responsable del brote de SARS de 2003. En marzo de 2020, la enfermedad, ampliamente distribuida a nivel mundial, fue reconocida como una pandemia por la OMS.

1. ASPECTOS ESTRUCTURALES DEL CORONAVIRUS SARS-COV-2

Desde un punto de vista general, una partícula vírica completa o virión consiste en un genoma de ácido nucleico empaquetado en una cubierta proteica (cápside) o una membrana (envoltura) constituida por una bicapa lipídica con proteínas. El virión puede contener proteínas estructurales y otras proteínas que participan en su ciclo de replicación en la célula huésped.

Las proteínas de la cápside o ciertas proteínas pueden asociarse con el genoma para formar la nucleocápside (el término «nucleocápside» se refiere al material genético envuelto en su cápside o al material genético asociado a ciertas proteínas rodeado por una envoltura). La cápside y la envoltura tienen, entre otras funciones, participar en la interacción del virus con la célula diana.

La cápside es una estructura rígida que soporta condiciones ambientales adversas como la desecación, los ácidos y los detergentes, incluidos el ácido del estómago y la bilis. La envoltura está compuesta de lípidos, proteínas

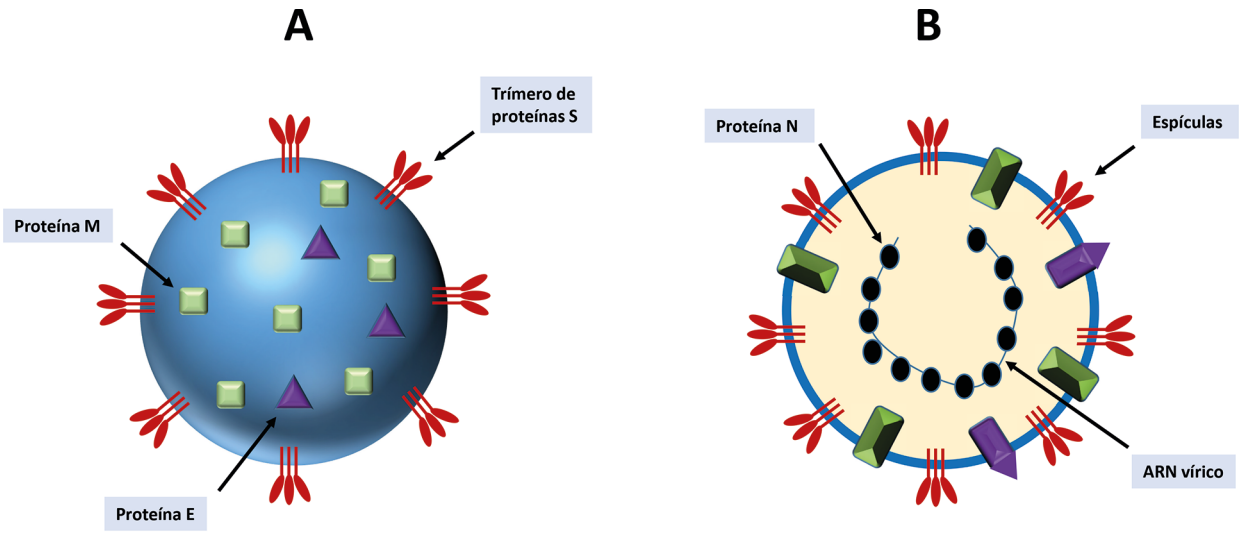


Figura 1. Representación esquemática del SARS-CoV-2 y sus proteínas estructurales. Esquema 3-D(A) y de sección del virión (B)

y glucoproteínas y se altera mediante la desecación, los ácidos, los detergentes y los disolventes, lo que da lugar a la inactivación del virus. Es por esto por lo que los virus con envoltura deben permanecer en determinadas condiciones de humedad y por lo general se transmiten por medio de fluidos (gotículas respiratorias, sangre, tejido, etc.).

En el caso concreto del SARS-CoV-2, es un virus de la gran familia de los coronavirus, que deben su nombre al hecho de tener una forma esférica de la que sobresalen unas espículas que les da la apariencia de una corona – por semejanza a la corona solar (fig. 1).

Existen siete tipos de coronavirus que infectan humanos (Ganesh *et al.* 2021), de los cuales cuatro de ellos (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1) son muy comunes y frente a los cuales las personas han desarrollado una respuesta inmune eficaz. Además de estos cuatro coronavirus, están los mencionados anteriormente: SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2.

Desde su aparición, han aparecido varias **variantes del SARS-CoV-2**, las cuales presentan mutaciones que la diferencian entre ellas (Aleem *et al.* 2022; Gupta *et al.* 2023). Si bien en principio se han conocido popularmente por el nombre del lugar donde se encontraron por primera vez, actualmente se denominan por una combinación de letras y números (tabla 1).

Las principales variantes descritas hasta el momento son: La variante alfa (también conocida como variante B.1.1.7, descubierta en Inglaterra a finales de 2020), la variante beta (también conocida como variante sudafricana o B.1.351), la variante gamma (también conocida como variante brasileña o P.2), la variante delta (también conocida como variante india o P.1) y, la más reciente, la variante Ómicron (variante B.1.529).

Tabla 1. Variantes del SARS-CoV-2 descritas hasta enero de 2022

Nombre de la variante	Denominación científica	País de origen
α	B.1.1.7	UK
β	B.1.351	Sudáfrica
γ	P.1	Brasil
δ	B.1.617.2	India
Ómicron	B.1.1.529	Varios

Estructuralmente, los coronavirus son virus esféricos de 100-160 nm de diámetro (Gorkhali *et al.* 2021; Polatoglu *et al.* 2023), con una envuelta de bicapa lipídica en cuyo interior contiene el genoma que consiste 29.881 pares de bases de ARN monocatenario de polaridad positiva con marcos abiertos de lectura para 27 proteínas, de las cuales cuatro (las proteínas N, E, M y S) forman parte de su estructura y por eso se denominan proteínas estructurales (fig. 1).

La proteína N de la nucleocápside está en el interior del virión asociada al RNA viral (Bai *et al.* 2021; Korn *et al.* 2023). Tiene un peso molecular de 43 a 50 KDa. Está fosforilada en varios restos de serinas y treoninas, que juegan un papel importante en el aumento de la afinidad por el RNA viral. Esta proteína se une a la proteína no estructural 3 (nsp3, por sus siglas en inglés: non structural protein) para dirigir el genoma al complejo de replicación y transcripción en el ciclo de replicación vírica.

La proteína E («E» por «envelope», en inglés) es un polipéptido de 75-109 aminoácidos, presente en pequeñas cantidades en la envoltura viral (Santos-Mendoza

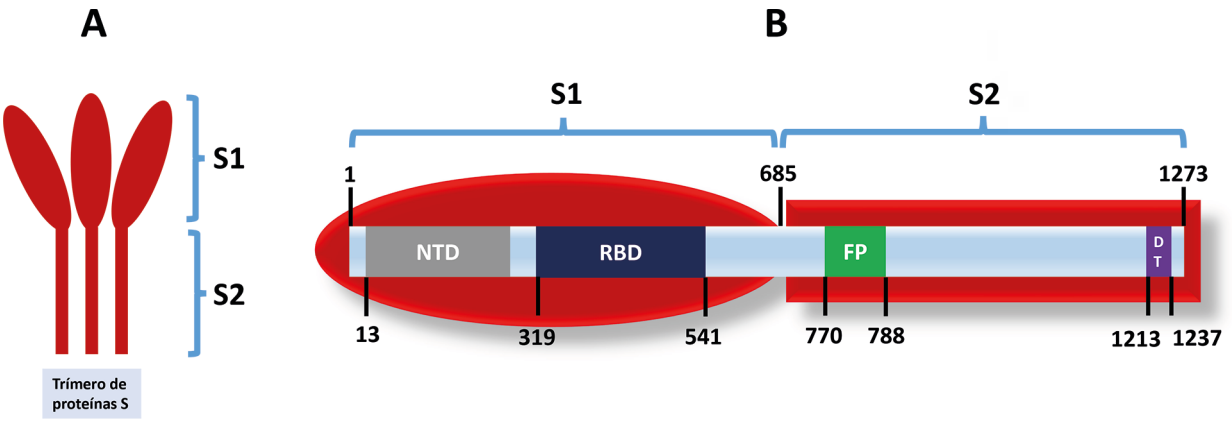


Figura 2. Esquema del trímero de proteína S del SARS-CoV-2 (A) y detalle de sus dominios de aminoácidos. NDT: Dominio N terminal. RBD: Dominio de unión al receptor. FP: proteína de fusión. DT: Dominio transmembrana

et al. 2023; Schoeman and Fielding 2020). Tiene un dominio N-terminal hidrófilo de 7-12 aminoácidos seguido de un dominio transmembrana hidrofóbico de unos 25 residuos y un dominio C-terminal hidrófilo largo. Participa en el ensamblado del virus y juega un papel fundamental en la maduración de partícula viral.

La proteína M («M» por «membrane», en inglés) es la proteína estructural más abundante y la responsable de darle la forma al virión (Thomas 2020; Williams *et al.* 2023). Su peso molecular está comprendido entre 25 y 30 kDa. Es una proteína de membrana con tres dominios. El extremo amino-terminal constituye un ectodominio pequeño y el endodominio C-terminal es la mayor parte de la molécula y está situada en el interior del virión. Esta proteína es la responsable del transporte transmembrana de nutrientes, la liberación del virión y la formación de la envoltura.

La cuarta proteína estructural es la proteína S («S» por «spike», en inglés), que forma las espículas que sobresalen de la envuelta del virus y contiene el dominio de unión al receptor de las células que infecta.

Las proteínas E, M y S están presentes en la superficie del virión. Además de estas proteínas estructurales, se han descrito otras 16 proteínas no estructurales, denominadas «nsp1-nsp16», las cuales tienen diferentes funciones en el ciclo de replicación vírica (Tam *et al.* 2023). Entre ellas destacan las funciones RNA polimerasa RNA-dependiente, helicasa, metil-transferasa y endoribonucleasa. El resto de las proteínas víricas tienen funciones accesorias.

Especial atención merece la proteína S, ya que las espículas del SARS-CoV-2 están formadas por tres unidades de esta proteína estructural que se asocian para formar un trímero (fig. 2A); es una proteína transmembranal de tipo I, muy glucosilada y es responsable de la entrada del virus en la célula huésped (Chen *et al.* 2023; Duan *et al.* 2020). Tiene 1,273 aminoácidos de un total de 9.860 aminoácidos codificados por el virus, siendo su peso molecular 180 kDa.

La proteína S está formada por dos dominios, llamados S1 y S2 (Xia 2021). El dominio S1 contiene principalmente un dominio de unión al receptor (RBD), que es responsable del reconocimiento del receptor celular e iniciar la infección. S2 se encarga de la fusión de las membranas viral y celular (fig. 2B).

S1 comprende los aminoácidos 13 a 685, siendo los aminoácidos 319-541 los correspondientes al RBD. La secuencia de aminoácidos 686-1273 constituyen el dominio S2, y el fragmento 770-788 es el péptido de fusión a la membrana celular.

Es de destacar que la última variante del coronavirus, Ómicron, tiene un gran número de mutaciones en la proteína S, en la que se han detectado 30 sustituciones de aminoácidos, tres pequeñas deleciones y una pequeña inserción (Parsons and Acharya 2023; Poudel *et al.* 2021). En comparación con las variantes anteriores, el número de mutaciones en Ómicron ha aumentado significativamente (fig. 3). En particular, 15 de las 30 substituciones están en el dominio RBD (fig. 4). Supuestamente, estas 15 mutaciones fortalecen la conexión del virus con la célula, lo cual permite que Ómicron se extienda más fácilmente que las anteriores variantes. Resulta sorprendente el número de mutaciones encontradas en Ómicron en comparación con las variantes anteriores, ya que alfa, beta, gama y delta solo presentaban en el dominio RBP 1, 3, 3, y 2 mutaciones, respectivamente. Debido a que la proteína S es el objetivo principal de las vacunas, es entendible que se produzcan reducciones importantes en la eficacia de las mismas y, por tanto, una menor protección frente a la infección. Una de estas mutaciones, N501Y (esto indica que en el aminoácido 501 se ha cambiado el aminoácido N, que representa a la asparagina, por el aminoácido Y, que representa a la tirosina), la comparte Omicron con otras variantes. Otras mutaciones son propias

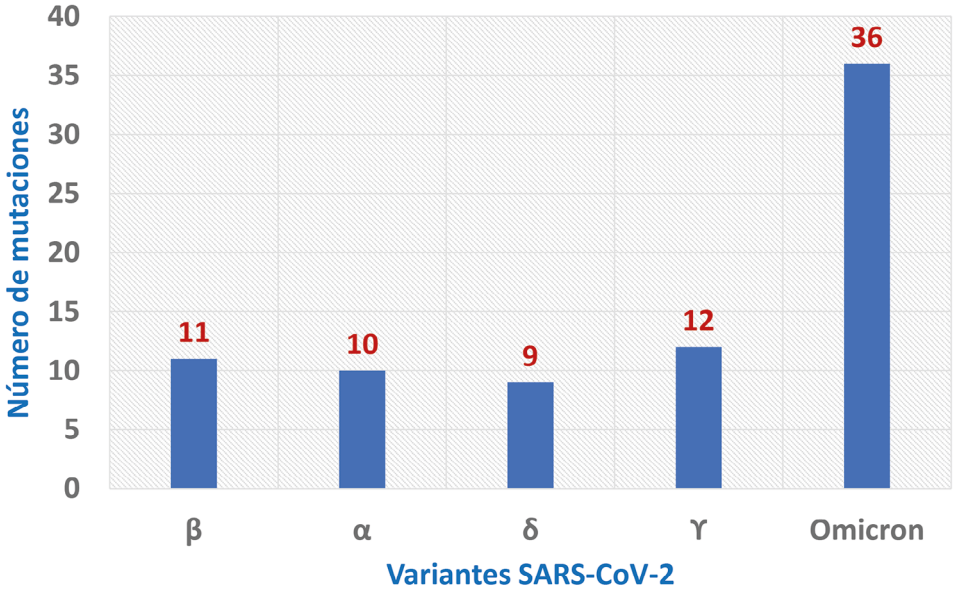


Figura 3. Número de mutaciones en la proteína S de las distintas variantes de SARS-CoV-2 identificadas hasta enero de 2022

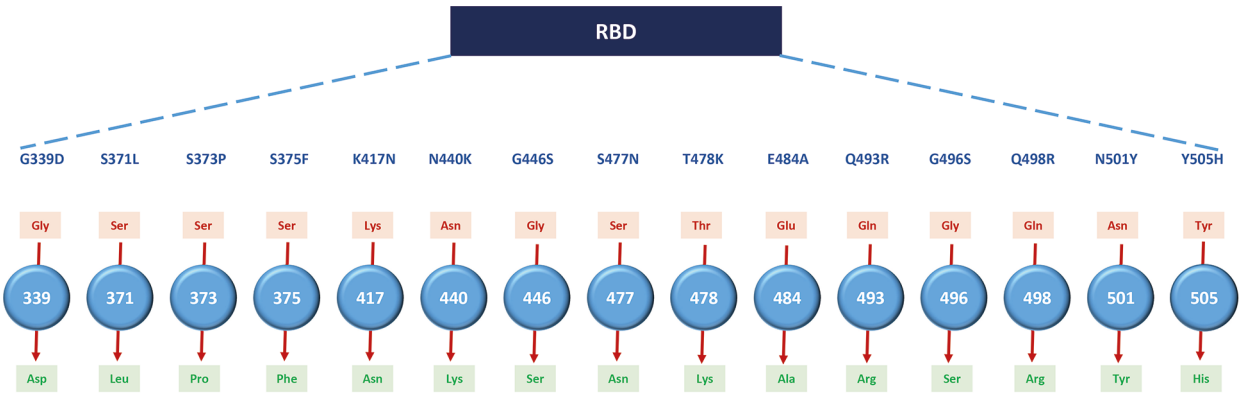


Figura 4. Mutaciones encontradas en la variante Ómicron. El dominio RBD comprende los aminoácidos 319-541. Se indican las posiciones y el cambio de los aminoácidos como consecuencia de las mutaciones

de Ómicron. Por ejemplo, las variantes beta y gamma comparten la mutación E484K pero Ómicron tiene un aminoácido diferente en ese lugar.

En relación al **dominio N-terminal**, no se sabe a ciencia cierta cuál es exactamente su función, aunque se piensa que puede ayudar a que los virus se adhieran a las células de alguna manera. En este dominio N-terminal de Ómicron se han producido diversos cambios: se intercambiaron cuatro aminoácidos, se eliminaron seis en total de tres ubicaciones y se agregaron tres nuevos en un solo lugar. Estas modificaciones también repercuten en que los anticuerpos producidos por las vacunas.

Otro dominio importante en la proteína S es el denominado «sitio de corte de la furina» (Peacock *et al.* 2021). Como se ha comentado, S1 es responsable de las primeras etapas de la entrada viral y contiene el dominio de unión al receptor. S2 actúa en la fusión, en una etapa posterior, de la célula y las membranas virales. Para que se produzca la fusión, la proteína S necesita ser escindida en la zona donde se unen S1 y S2 por las proteasas que se encuentran en superficie de las células huésped (ver más adelante). Este paso es crítico, ya que permite exponer las secuencias del dominio FP de fusión (fig. 2). Una de estas proteasas es la furina, una proteasa unida a la membrana que pertenece a la familia de las proteínas convertasas. En este dominio correspondiente al sitio de escisión de la furina también se han producido diferentes mutaciones, lo cual parece permitir que la variante Ómicron entre más fácilmente en las células.

2. INGRESO DE SARS-COV-2 EN LA CÉLULA HUÉSPED. INTERACCIÓN CON LOS RECEPTORES Y PROTEASAS CELULARES DE LA CÉLULA HUÉSPED

La unión y entrada viral en la célula huésped es el primer paso de la infección y uno de los procesos más importantes en el ciclo de vida del virus, siendo también

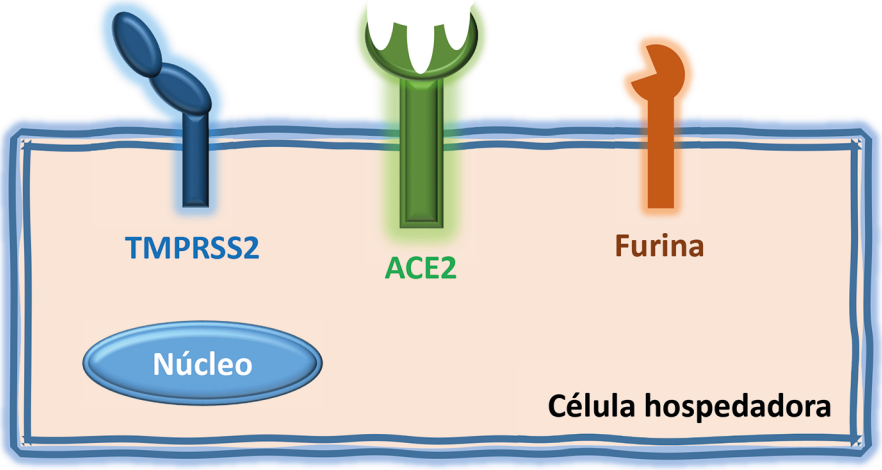


Figura 5. Moléculas implicadas en la interacción del SARSCoV-2 con la célula huésped. Además del receptor ACE2, la unión eficaz de la proteína S del virus depende de las proteasas TMPRSS2 y/o furina

un objetivo clave para el desarrollo de vacunas y terapias antivíricas. En este proceso las principales moléculas implicadas son la proteína S del SARS-CoV-2, el receptor ACE2 de la célula huésped y dos proteasas localizadas en la superficie celular (Hoffmann *et al.* 2020). Estas proteasas son la serin-proteasa transmembrana de tipo II (TMPRSS2) y la ya mencionada furina (fig. 5). Ambas facilitan la unión de la proteína S del SARS-CoV-2 y posterior fusión de la membrana viral con la membrana lipídica del huésped para permitir que el genoma viral se libere en el citoplasma (Bohan *et al.* 2021).

El virus entra en las células por el reconocimiento de la proteína ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2), una metaloproteinasa que contiene zinc unida a membrana con actividad de monocarboxipeptidasa que utiliza como receptor. Fisiológicamente, ACE2 participa en el sistema renina-angiotensina y que no hay que confundir con la clásica ECA (angiotensin-converting enzyme), la cual, como se explica seguidamente, tiene un efecto fisiológico antagónico sobre la tensión arterial. ACE2 fue descubierta en el año 2000 y consta de 805 (Hooper *et al.* 2020).

Además de ACE2, se han descrito otras moléculas que sirven como receptores alternativos para SARS-CoV-2 (Amraei *et al.* 2021): lectinas tipo C, DC-SIGN y L-SIGN, las cuales están implicadas en el reconocimiento de una amplia gama de patógenos y reconocen los polisacáridos de la superficie del virión y permitiendo que el virus se adhiera a la célula. Otros receptores de fosfatidilserina, TIM y TAM, favorecen la entrada de una amplia gama de virus con envoltura al unirse a la fosfatidilserina en la membrana virión (Bohan *et al.* 2021). También, proteínas como CD147, una glicoproteína transmembrana que se expresa en células epiteliales e inmunes, actúan como receptor alternativo para la infección por SARS-CoV-2 (Fenizia *et al.* 2021).

Se da la circunstancia que el virus SARS-CoV-2 entra en el organismo principalmente por vía inhalatoria y que el 83 % de las células que expresan ACE2 son células epiteliales alveolares tipo II o neumocitos tipo II (fig. 6), que representa el 5 % de la superficie alveolar (Han *et al.* 2020). Este tipo celular es el responsable de secretar el surfactante y es progenitor de los neumocitos tipo I en caso de lesión tisular. Todo esto influye en que se facilite la replicación de SARS-Cov-2 en el pulmón y que este sea el órgano afectado preferentemente por el virus. Tras unirse SARS-Cov-2 a ACE2 del endotelio capilar y del neumocito tipo 2 se afecta la barrera alveolocapilar y se produce un edema que puede desembocar en una neumonía bilateral extensa asociada al desarrollo del síndrome de dificultad respiratoria aguda. Además de las vías respiratorias, ACE2 se encuentra también en el corazón, el riñón, endotelio vascular e intestino. Se ha sugerido que la expresión de ACE2 en la superficie luminal de las células epiteliales intestinales podría constituir otro sitio de entrada para SARS-CoV-2. También se puede encontrar en forma soluble (forma acortada) en plasma. Dado que ACE-2 es la puerta de entrada del virus a las células del organismo es importante conocer la función de esta proteína y así poder tener una idea del alcance y manifestaciones clínicas de la COVID-19.

El **sistema renina-angiotensina-aldosterona** (SRAA) está constituido por un conjunto de reacciones que participan en la regulación de la presión arterial (Mirabito Colafella *et al.* 2019). Esquemáticamente, si la presión arterial baja por disminución del volumen de sangre o por disminución de los niveles de sodio, los riñones liberan la enzima renina a la sangre (fig. 7). La renina rompe el **angiotensinógeno**, que es una proteína producida en el hígado y liberada al sistema circulatorio, para producir angiotensina I. La angiotensina I se convierte en

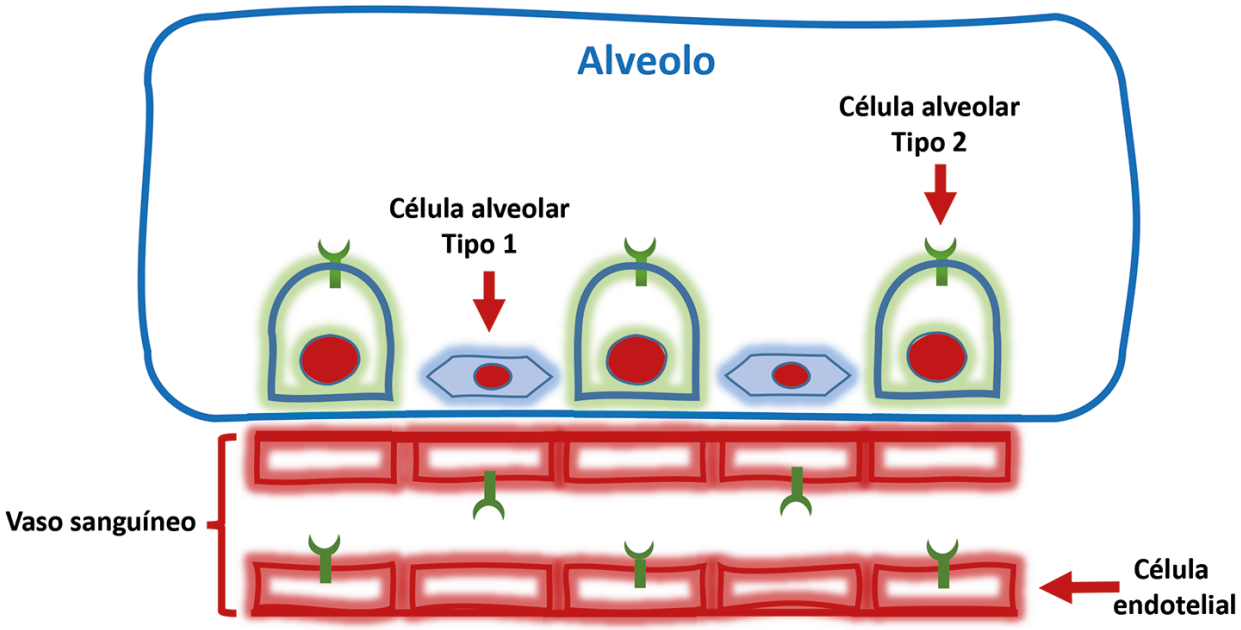


Figura 6. Esquema de la localización del recepto ACE en células alveolares y endoteliales

angiotensina II al eliminarse dos residuos de aminoácidos C-terminales por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), una dipeptidil carboxipeptidasa presente principalmente en los capilares de los pulmones pero también se puede encontrar en las células endoteliales y las células epiteliales del riñón. La distribución tisular de ACE2 puede reflejar funciones no enzimáticas de ACE2, como la de actuar en el transporte de aminoácidos.

La angiotensina II es la proteína fisiológicamente activa que provoca la constricción de las paredes musculares de las arteriolas, aumentando la presión arterial. También reduce la producción de orina y la tasa de filtración glomerular. La angiotensina I y II pueden procesarse posteriormente para producir angiotensina III que estimula la liberación de aldosterona y angiotensina IV. La aldosterona retiene agua y sodio lo cual contribuye al aumento de la presión arterial.

ACE y ACE2 tienen funciones diferentes y sus centros catalíticos son distintos, aunque comparten un 42 % de homología estructural. Consecuentemente, los fármacos inhibidores de la ACE no inhiben ACE2. Mientras que la ACE cataliza el paso de angiotensina I a angiotensina II, ACE2 convierte la angiotensina II en el heptapéptido denominado «angiotensina 1-7» (un antagonista funcional de la angiotensina II) y la angiotensina I en angiotensina 1-9 sin actividad biológica conocida. ACE2 degrada la angiotensina II, uniéndose a ella con una afinidad 400 veces mayor que a la Angiotensina I.

Como puede verse, ACE2 regula negativamente el sistema SRAA, ya que al convertir angiotensina II en angiotensina 1-7 disminuye la acción vasoconstrictora del efector primario del SRAA, que es la angiotensina II. Por otro lado, angiotensina 1-7 tiene efectos vasodilatadores a través de su unión al receptor *Mas*, que genera la activación de la fosfatidil inositol kinasa, con aumento de la formación de óxido nítrico e inhibición de la protein kinasa C y de la expresión de colágeno. La ACE2, al generar vasodilatación y tener un efecto antifibrótico, ha sido considerada un inhibidor de ACE endógeno.

Una consecuencia de la unión de la proteína S del virus con ACE2 es que se inhibe su actividad, con incremento de los niveles de angiotensina II y reducción de la angiotensina 1-7, lo que incrementa la permeabilidad vascular pulmonar y favorece la vasoconstricción. La terapia crónica con inhibidores de ACE o bloqueantes de los receptores de angiotensina aumenta la expresión de ACE2. Este incremento de ACE2 puede tener un efecto dual: por un lado, ejerce efecto cardioprotector, vasodilatador y antagonista de la lesión pulmonar aguda, al degradar la angiotensina II y favorecer la formación de angiotensina 1-7 y angiotensina 1-9; por otro, puede aumentar la puerta de entrada al SARS-CoV-2.

A nivel molecular, para que se produzca su fusión con la membrana celular, SARS-CoV-2 también requiere la participación de la proteasa TMPRSS2, la cual corta la espícula tras la unión con ACE2 y, en mayor o menor medida, la acción proteolítica de la furina (Brätigam *et al.* 2023). El virus, a través del dominio S1 se une al centro catalítico de ACE2 lo que desencadena un cambio conformacional en la proteína S, permitiendo su degradación proteolítica por TMPRSS2. Esto posibilita la fusión del virus a la membrana celular y facilita el ingreso del virus al interior de la célula huésped. En este sentido,

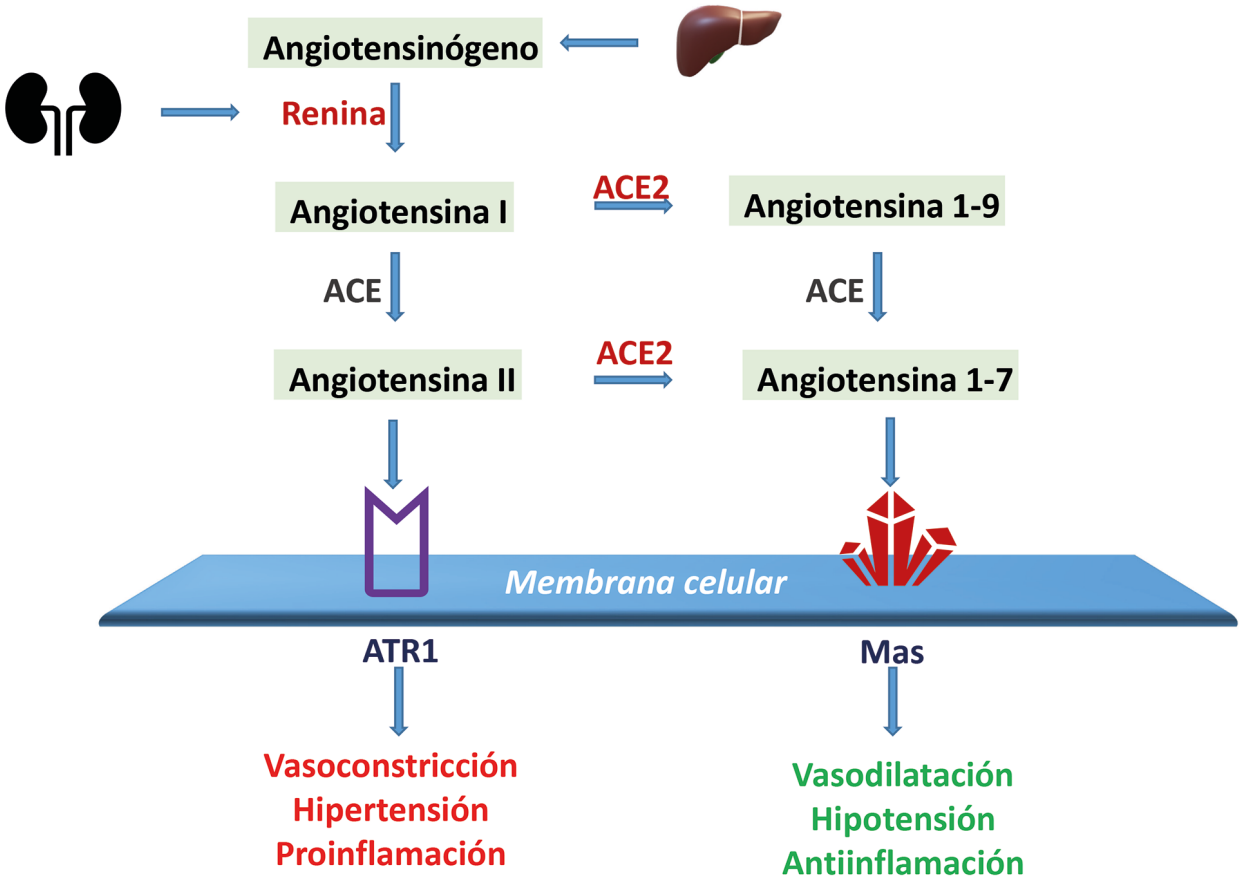


Figura 7. Moléculas implicadas en el sistema renina-angiotensina

TMPRSS2 sería también un potencial objetivo terapéutico para disminuir la infección viral.

El análisis de expresión de diferentes tejidos indica que ACE2 y TMPRSS2 se expresan especialmente en ciertas células epiteliales de la cavidad nasal (las células caliciformes que producen mucus y células epiteliales nasales ciliadas), de los pulmones (en los neumocitos que mantienen los alveolos abiertos) y del intestino. La asociación entre la infección por SARS-CoV-2 y la anosmia (pérdida del olfato) puede reflejar la expresión de ACE2 y TMPRSS2 en células sustentaculares, que mantienen la integridad de las neuronas sensoriales olfativas. No obstante, la cantidad y distribución de la expresión de ACE2 no puede ser el único factor que afecta la progresión de la enfermedad, porque los tres coronavirus humanos que usan ACE2 para entrar en las células presentan una patogenicidad totalmente diferente.

Con relación a la furina, esta proteasa se expresa en muchos órganos, incluidos los pulmones (Wu *et al.* 2020). Tras la unión del SARS-CoV-2 a ACE2 con su dominio RBD, la furina cataliza la escisión de la proteína S (S1/S2), necesaria para la entrada viral en la célula. Esta vía de activación mediada por furina, permitiría que el SARS-CoV-2 tenga una menor dependencia de la co-expresión de TMPRSS2 en la superficie celular para infectar las células, siendo capaz de entrar en una amplia gama de células con menor expresión de TMPRSS2.

3. MECANISMO DE REPLICACIÓN, TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN DEL SARS-COV-2

Una vez que ingresa el virus está en el interior celular, se requiere la acidificación endosómica, es decir, una disminución de pH mediada por lisosomas, permitiendo la unión de la membrana del endosoma con la envoltura viral, liberando su nucleocápside al citoplasma (Wu *et al.* 2023) (fig. 7).

A partir de ahí, el virus usa la maquinaria celular para traducir los «marcos abiertos de lectura» del RNA viral (se denomina «marco abierto de lectura» o «marco de lectura abierta» –ORF, por sus siglas en inglés: *open reading frame*–) a la secuencia de ARN comprendida entre el codón de inicio AUG de la traducción y un codón de terminación. Como se ha comentado, SARS-CoV-2 es un virus de ARN de sentido positivo monocatenario con 14 ORFs (Alsobaie 2021). Un ARN viral de sentido positivo significa que puede ser traducido directamente en

las proteínas deseadas, ya que es idéntico a un ARNm en la célula hospedadora. En el caso de que el ARN del virión tenga sentido o cadena negativa (complementario al ARNm) debe de ser copiado en un ARNm de sentido positivo complementario antes de que las proteínas puedan ser sintetizadas.

El genoma codifica tres tipos de proteínas: 1) dos poliproteínas grandes, pp1a y pp1ab, que se dividen en las 16 proteínas no estructurales (NSP's), que son necesarias para la síntesis de ARN viral y otras funciones; 2) las cuatro proteínas estructurales (S, E, M y N), que son esenciales para la entrada y el ensamblaje viral; 3) nueve proteínas accesorias, que se cree que contrarrestan la inmunidad del huésped durante la infección.

Las poliproteínas pp1a y pp1ab se procesan autoprotolíticamente en las 16 NSP's (Malone *et al.* 2022). Esta escisión auto proteolítica de pp1a y pp1ab en las 16 NSP's es posible ya que dos de los fragmentos de estas poliproteínas tienen actividad proteolítica (Ullrich and Nitsche 2020). Estos fragmentos proteolíticos forman parte de lo que serían las NSP3 y NSP5. El fragmento de la NSP 3 con actividad proteolítica es similar a la papaína y por eso se denomina PLPro (siglas en inglés de papain-like protease). El fragmento de NSP5, que tiene actividad proteolítica similar a la quimiotripsina, se denomina Mpro (siglas en ingles de main protein) o es llamada también proteasa tipo 3C (3CLpro). Estas proteasas son esenciales para la replicación del coronavirus. La función principal de estas proteasas es procesar las poliproteínas virales de manera coordinada. El autoprocesamiento de la poliproteína 1a y 1ab por Mpro ocurre en 11 sitios y el de PLpro en tres, lo que resulta en la producción de las 16 NSP's. Debido a la función que realizan, estas proteasas son consideradas unas dianas terapéuticas en la investigación de fármacos antivirales contra el SARS-CoV-2.

A continuación, las proteínas no estructurales se reorganizan en vesículas de doble membrana que se derivan del retículo endoplasmático rugoso en la región perinuclear y forman el complejo replicasa-transcriptasa (RTC), creando un entorno adecuado para la síntesis de ARN de sentido negativo (-) a través de la replicación y la transcripción, de manera que el RTC replica y sintetiza ARN genómico (+) de longitud completa y un conjunto de 7 a 9 ARNm subgenómicos (+) (sgARN) (Brant *et al.* 2021), incluidos los que codifican todas las proteínas estructurales S, M, E, N (siendo la proteína N la más expresada de las cuatro) y las proteínas accesorias. El ARN (+) genómico viral recién sintetizado se une a la proteína N originando la nucleocápside.

Las proteínas S, M, E y las accesorias, son sintetizadas en las membranas del retículo endoplásmico y luego transportadas al complejo de Golgi para ser ensambladas con la nucleocápside, produciendo nuevas partículas víricas que, mediante un sistema de transporte de vesículas, viajan hasta la superficie, se fusionan posteriormente con la membrana plasmática liberándose los viriones nacientes de la célula infectada por exocitosis. Mediante este ciclo, cada virus puede generar entre 10.000 y 100.000 copias de sí mismo (Sender *et al.* 2021).

4. AFECTACIÓN DE LA COAGULACIÓN Y EL SISTEMA VASCULAR POR SARS-COV-2

Entre los cuadros clínicos producidos por SARS-CoV-2 están las coagulopatías, causadas por la afectación de los mecanismos bioquímicos que participan en la coagulación (Szilveszter *et al.* 2023). La trombosis o enfermedad trombótica es una respuesta hemostática exagerada que lleva a la formación de trombos o coágulos en el sistema circulatorio que obstruyen el flujo sanguíneo local. Estos trombos pueden desprenderse del sitio en el que se originan y obstruir vasos sanguíneos en otro tejido u órgano produciendo una embolia, que es la falta brusca de riego a un determinado órgano, como consecuencia de la obstrucción de una arteria debido a la llegada de uno o múltiples trombos procedentes de alguna zona del cuerpo.

Los trombos pueden ser arteriales o venosos. En el caso de la COVID-19, se han detectado complicaciones trombóticas y gran parte de los trombos se producen en el sistema venoso, aunque también pueden presentarse trombos en la circulación arterial. Suelen generarse en las extremidades inferiores o en la arteria pulmonar o sus ramas.

La alta prevalencia de trombosis pulmonar sin antecedentes de trombosis venosa profunda, junto con las microtrombosis diseminada y el depósito difuso de fibrina, sugieren que en un inicio la alteración de la hemostasia ocurre en el pulmón y de ahí se extiende al resto del organismo (Sakr *et al.* 2020). Las alteraciones de la hemostasia que se observan en COVID-19 se observa incluso en pacientes con tratamiento anticoagulante.

El sistema hemostático tiene como principal función evitar la pérdida de sangre desde los vasos sanguíneos. Sus elementos más relevantes son el endotelio vascular, las plaquetas y los factores de la coagulación. Cuando se produce una herida (daño vascular), las plaquetas se adhieren al colágeno del subendotelio vascular a través de los receptores presentes en las mismas como, por ejemplo, la glucoproteína Ib. Esta proteína está siempre presente en la superficie de la plaqueta y se adhiere al colágeno y al Factor de Von Willebrand (FvW), que está entre las fibras de colágeno. Posteriormente, las plaquetas se agregan entre sí uniéndose con el fibrinógeno a través de su receptor Gp IIb IIIa.

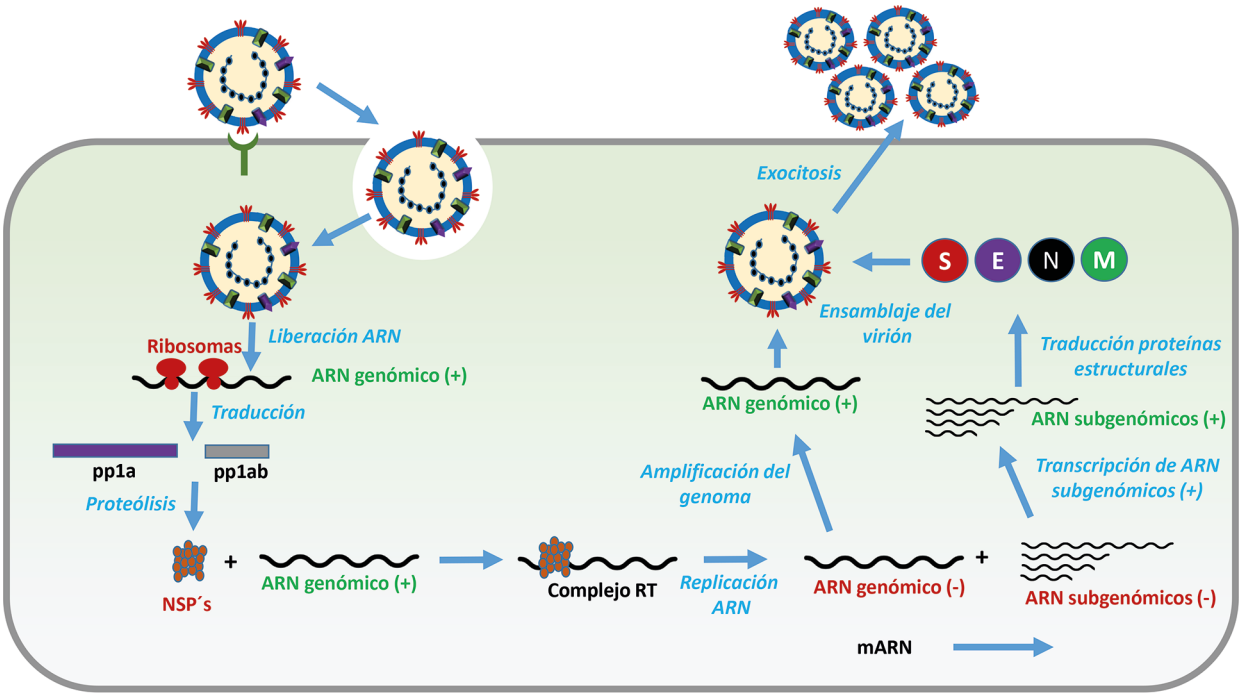


Figura 8. Esquema del ciclo de replicación vírica en el interior de la célula huésped

La adhesión y agregación plaquetaria activa la coagulación y la producción de trombina, una enzima de la sangre que convierte el fibrinógeno en fibrina. La red de fibrina se añade al aglomerado plaquetario previamente formado, dando lugar a la formación del coágulo, el cual se elimina posteriormente por la acción del sistema fibrinolítico. Todo este proceso está regulado por diversos mecanismos que evitan la activación en ausencia de daño endotelial.

Los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la coagulopatía en COVID-19 no se conocen completamente, pero la formación de trombos en pacientes con COVID-19 puede ser debido a (fig. 8):

1. Un efecto directo de SARS-CoV-2 sobre las células endoteliales, al unirse al receptor ACE2, muy presente en estas células de venas y arterias. La infección por el virus a través de la ACE2 ocasiona endotelitis, caracterizada por disfunción y muerte endotelial (Sender *et al.* 2021). También, debido al SARS-CoV-2 se pierde el efecto vasodilatador y anticoagulante de ACE2, aumentándose el riesgo de trombosis. Consecuentemente, la disminución de ACE2 produce vasoconstricción, como se ha comentado antes, y disminuye la función anticoagulante del endotelio.
2. La activación de la coagulación similar a producida ante una situación de sepsis. La respuesta inducida del sistema inmunitario ante la infección por SARS-CoV-2 puede provocar un estado inflamatorio caracterizado por una activación de monocitos que producen distintas citocinas y otros mediadores inflamatorios, los cuales activan plaquetas, neutrófilos, y células endoteliales dando lugar a una disfunción endotelial local o/y sistémica que impulsa los mecanismos de coagulación que favorece la formación de trombos en las paredes de las venas y arterias (Savla *et al.* 2021). Es decir, se modifican las propiedades del endotelio de un estado anticoagulante a uno procoagulante.

A nivel molecular se produce la interrupción del glicocálix, se liberan grandes cantidades de Factor Tisular (FT) por el endotelio, macrófagos y plaquetas activadas con lo que se inicia la coagulación. El endotelio y las plaquetas liberan Factor de Von Willebran (vWF) mencionado anteriormente, que favorece la adhesión y activación plaquetaria contribuyendo a la trombosis. La inflamación induce el aumento de fibrinógeno, factor VIII que favorece aún más la trombosis y PAI-1 endotelial que disminuye la fibrinolisis. Las plaquetas activan a los neutrófilos y la formación de las denominadas «trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), compuestas de ADN procoagulante, histonas y otros patrones moleculares asociados al daño celular. Todo lo anterior lleva al desarrollo de los fenómenos micro y macrotrombóticos. El aumento de dímeros D es un marcador de la gravedad de la coagulopatía en COVID-19 porque refleja la formación reciente y el tamaño de los trombos en esta enfermedad. Se postula que los pacientes con comorbilidades como la diabetes y la hipertensión tienen un aumento del riesgo debido a que ya tienen previamente disfunción endotelial

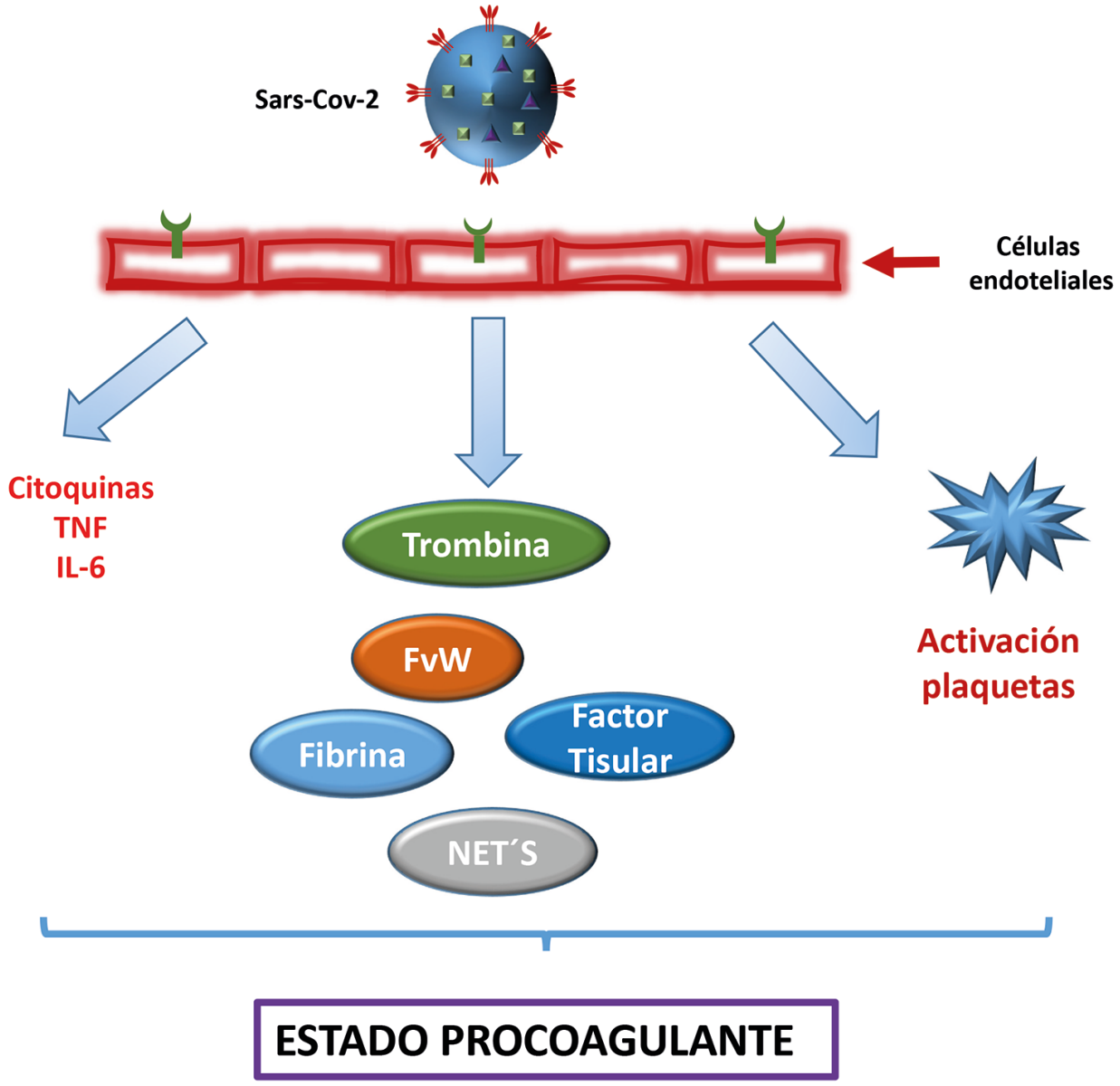


Figura 9. Mecanismos involucrados en las coagulopatías de pacientes con COVID-19

(Qi *et al.* 2021). Todos estos procesos son similares a los que ocurren en la coagulopatía intravascular diseminada, una enfermedad producida por la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1, IL-6) debida a la liberación de endotoxinas durante infecciones sistémicas bacterianas.

5. ESTRÉS OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR PRODUCIDO POR SARS-COV-2

Los pacientes hospitalizados con COVID-19 tienen aumentado significativamente los niveles de estrés oxidativo (Georgieva *et al.* 2023). El estrés oxidativo es el conjunto de daños moleculares producidos por los radicales libres y especies oxidantes como resultado de un desequilibrio entre su producción y los mecanismos antioxidantes. Además de la infiltración de neutrófilos y la liberación de especies reactivas de oxígeno, las infecciones virales se asocian con una disminución de las defensas antioxidantes.

La exposición a prooxidantes generalmente conduce a la translocación al núcleo del factor de transcripción NRF2, el cual detecta el estado redox y activa las defensas antioxidantes. Las infecciones virales respiratorias se han asociado con la inhibición de las vías activadas por NRF2 y la activación de otro factor de transcripción, NF-κB, implicado en la promoción de la inflamación y el daño oxidativo durante estas infecciones (Gómez *et al.* 2023). Además, se ha observado una disminución de los niveles de expresión de la enzima antioxidante

superóxido dismutasa 3 en los pulmones de pacientes con COVID-19. No cabe duda de que el aumento del estrés oxidativo en la infección por SARS-CoV-2 contribuye a un peor pronóstico de la enfermedad, ya que, además de los efectos perjudiciales del SARS-CoV-2 sobre las células epiteliales y endoteliales alveolares con endoteliitis procoagulativa, un exceso de compuestos oxidantes también puede afectar a las funciones de las células pulmonares.

Los neutrófilos juegan un papel importante en el sistema inmune innato constituyendo la primera línea de defensa del organismo. Una vez activados, migran hasta el tejido afectado y, como parte de su función biológica producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno en el proceso de fagocitosis, las cuales incrementan la respuesta inmunopatológica del huésped, resultando en una enfermedad más grave al hacer que una respuesta inflamatoria local se vuelva sistémica. Además de la fagocitosis, los neutrófilos capturan a los agentes patógenos mediante la formación de las NET's mencionadas (Veras *et al.* 2020). Cantidades fisiológicas de NETs desempeñan un papel importante en las infecciones, pero valores altos puede producir daño tisular.

El exceso de especies reactivas de oxígeno puede causar también la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de los glóbulos rojos y afectar la funcionalidad del grupo hemo. Esto conllevaría tanto a una alteración en los fenómenos de difusión de oxígeno y dióxido de carbono como a la capacidad de deformabilidad de los glóbulos rojos en los vasos capilares, lo que puede provocar trombosis. La reactivación de los neutrófilos en respuesta a la modificación de la membrana de los glóbulos rojos alimenta aún más este círculo vicioso. Este efecto acumulativo de las especies reactivas de oxígeno sobre las funciones de las células pulmonares y de los glóbulos rojos contribuye en gran medida a la insuficiencia respiratoria hipóxica observada en los casos más graves de COVID-19.

El exceso de compuestos oxidantes puede afectar también al equilibrio Fe^{2+}/Fe^{3+}. Teniendo en cuenta que el hierro debe mantenerse como Fe^{2+} para unir oxígeno, la protonación del ion superóxido por el hierro mantendría a este metal como hierro (III) incapaz de unir oxígeno.

Teniendo en cuenta que los pacientes hospitalizados con COVID-19 no solo tienen aumentado sus niveles de estrés oxidativo sino que presentan bajos niveles de glutatión, se ha propuesto que la suplementación con los precursores de este tripéptido pude ser beneficioso en pacientes con COVID-19 para reducir los niveles de estrés oxidativo (Lapenna 2021), mejorar los niveles de glutatión y reducir la inflamación. Además, si no se controla el estrés oxidativo en los enfermos con COVID-19, el alto nivel de oxidación puede aumentar las posibilidades de mutación del virus y se puede convertir en una variante más agresiva.

6. FERRITINA PLASMÁTICA EN PACIENTES CON COVID-19

Una característica de la COVID-19 es el aumento de la concentración sérica de ferritina (Perottet *et al.* 2022). La ferritina es principalmente una proteína celular con un peso molecular de 450 kDa. Tiene una estructura globular y está presente mayoritariamente en las células del sistema reticuloendotelial (este sistema está formado por los monocitos, macrófagos y precursores), en el hígado, la médula ósea y el músculo esquelético, aunque se ha identificado en casi todos los tejidos corporales. Su función más conocida es la de almacenar iones de hierro intracelulares. Gran parte del hierro almacenado en la ferritina es accesible para las necesidades metabólicas, siendo una de las más importantes la cesión del hierro para la síntesis de la hemoglobina.

La ferritina comprende 24 subunidades de dos tipos: subunidad H y subunidad L (Wang *et al.* 2010). Dependiendo del tipo de tejido y el estado fisiológico de la célula, la proporción de subunidades H/L en la ferritina puede variar ampliamente. Mientras que la ferritina del hígado y bazo tiene una alta proporción de subunidad L en otros tejidos como el corazón o los riñones abundan las subunidades H.

La ferritina también se encuentra en pequeñas cantidades en el suero cuyos niveles se usan como un marcador indirecto de la cantidad total de hierro almacenado en el cuerpo. La ferritina sérica se compone principalmente de subunidades L que indican un origen hepático, y es glicosilada. La ferritina sérica contiene solo pequeñas cantidades de hierro y sus funciones biológicas no se conocen en su totalidad (Daru *et al.* 2017).

La cantidad de ferritina citoplasmática está regulada por las cantidades intracelulares de hierro pero también por diversas citoquinas a niveles transcripcional, postranscripcional y traslacional durante el desarrollo, la diferenciación celular, la proliferación y la inflamación. La expresión de ferritina también está regulada por el estrés oxidativo, las hormonas (hormona tiroidea), factores de crecimiento, segundos mensajeros, la hipoxia-isquemia e hiperoxia, y el lipopolisacárido, siendo este último un componente de la membrana externa de las bacterias Gram. Además, las prostaglandinas involucradas en las respuestas inflamatorias y febriles inducen la ferritina de la cadena L en monocitos humanos.

La ferritina, además de fijar y almacenar el hierro de una forma biológicamente disponible para procesos celulares vitales, protege a las proteínas, lípidos y al ADN de la toxicidad de este elemento metálico (Galay *et al.* 2014).

Además, la ferritina tiene otras funciones y, por ejemplo, participa en la inflamación. La ferritina es un reconocido «reactante de fase aguda» que son componentes de la sangre cuya concentración aumenta ante procesos inflamatorios, infecciones, tumores, etc. (Thachil 2016). Estas proteínas aumentan en estas situaciones para actuar en la defensa celular contra el estrés oxidativo y la inflamación. De hecho, la hiperferritinemia indica la presencia de virus y bacterias en el cuerpo y se asocia con varias afecciones inflamatorias, como sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y síndrome de disfunción multiorgánica. En pacientes críticos, la hiperferritinemia se asocia con la gravedad de la enfermedad subyacente.

No obstante, los mecanismos exactos y detallados de secreción de la ferritina no se entienden completamente y aun se debate si se libera simplemente por las células dañadas o por un proceso de secreción activa mediante exosomas (Truman-Rosentsvit *et al.* 2018). Supuestamente, el aumento de la concentración de ferritina transmite protección a los organismos al reducir la biodisponibilidad del hierro a los patógenos y al limitar el daño por radicales libres generados en presencia de Fe(II).

Por lo tanto, parece ser que las células reaccionan ante un escenario de inflamación y estrés oxidativo produciendo grandes cantidades de ferritina. Así, la hiperferritinemia observada en pacientes con COVID-19 puede ser inducida en respuesta a la inflamación. Sin embargo, se desconoce si la ferritina es solo un signo de progresión de la enfermedad o tiene un papel modulador en la patogénesis de la enfermedad. Los macrófagos, que producen citoquinas y representan la mayoría de las células inmunes en el parénquima pulmonar, podrían ser responsables de la secreción de ferritina sérica. Además, la síntesis de ferritina puede ser inducida por varios estímulos inflamatorios, incluidas las citoquinas, como la IL-6 producida por los macrófagos de forma excesiva (tormenta de citoquinas), lo que está implicado en una mayor gravedad y resultados adversos.

Se desconoce por el momento cuál es el papel potencial de esta proteína durante la inflamación después del desarrollo de la enfermedad COVID-19. Si bien algunos autores han sugerido que las células reaccionarían ante una situación proinflamatoria y de estrés produciendo grandes cantidades de ferritina sérica para unir iones de hierro libres para reducir el daño, esto no se ha comprobado *in vivo*.

7. APARICIÓN DE NUEVAS VARIANTES

Los virus, a medida que se propagan, sufren constantemente modificaciones genéticas que dan lugar a nuevas variantes del virus. Estas mutaciones pueden repercutir en la gravedad de la enfermedad, en su facilidad de propagación o en su resistencia a las estrategias de control (tratamientos y vacunas). Todas las variantes con cambios genéticos similares forman lo que se denomina «linaje». Un linaje es, por tanto, un conjunto de variantes de virus genéticamente relacionados derivados de un ancestro en común. Desde la aparición en noviembre de 2021, todos los linajes que circulan actualmente se clasifican como parte de la variante Ómicron.

En la actualidad, hay webs de organismos oficiales centradas en describir todas las variantes del SARS-CoV-2 que van surgiendo, sus características moleculares, y su repercusión en la salud, clasificándolas según sean preocupantes, de interés o estén bajo vigilancia con la finalidad de coordinar de manera internacional la respuesta a la COVID-19. Algunos ejemplos de estos sitios web son el de la Organización Mundial de la Salud (https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/tracking-SARS-CoV-2-variants), los Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades de los EEUU (https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#datatracker-home) o el Centro Europeo para la prevención y control de la enfermedades (https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern?etrans=es).

BIBLIOGRAFÍA

ALEEM, A., AKBAR SAMAD, A.B. & SLENKER, A.K. (2022), *Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics against Coronavirus (COVID-19)*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. LLC.

ALSOBAIE, S. (2021), Understanding the Molecular Biology of SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic: A Review. Infection and Drug Resistance 14: 2259-2268.

AMRAEI, R., YIN, W., NAPOLEON, M.A., SUDER, E.L., ..., CHITALIA, V., COSTELLO, C.E. & RAHIMI, N. (2021), CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN Act as Receptors for SARS-CoV-2. bioRxiv: The Preprint Server for Biology; DOI: 10.1101/2020.06.22.165803

BAI, Z., CAO, Y., LIU, W. & LI, J. (2021), The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. Viruses 13(6): 1115.

BOHAN, D., ERT, H.V., RUGGIO, N., ..., MINNA, J., LORENS, J.B. & MAURY, W. (2021), Phosphatidylserine Receptors Enhance SARS-CoV-2 Infection: AXL as a Therapeutic Target for COVID-19. bioRxiv: The Preprint Server for Biology.

BRANT, A.C., TIAN, W., MAJERCIAK, V., YANG, W. & ZHENG, Z.-M. (2021), SARS-CoV-2: From Its Discovery to Genome Structure, Transcription, and Replication. Cell & Bioscience 11(1): 136.

BRÄUTIGAM. K., REINHARD, S., WARTENBERG, M., ..., BÖSMÜLLER, H., KLINGEL, K. & SCHÜRCH, C.M. (2023), Comprehensive Analysis of SARS-CoV-2 Receptor Proteins in Human Respiratory Tissues Identifies Alveolar Macrophages as Potential Virus Entry Site. Histopathology 82(6): 846-859.

CHEN, D.Y., CHIN, C.V., KENNEY, D., ..., CROSSLAND, N.A., DOUAM, F. & SAEED, M. (2023), Spike and nsp6 Are Key Determinants of SARS-CoV-2 Omicron BA.1 Attenuation. Nature 615(7950): 143-150.

DARU, J., COLMAN, K., STANWORTH, S.J., DE LA SALLE, B., WOOD, E.M. & PASRICHA, S.R. (2017), Serum Ferritin as an Indicator of Iron Status: What Do We Need to Know? The American Journal of Clinical Nutrition 106(Suppl 6): 1634s-1639s.

DUAN, L., ZHENG, Q., ZHANG, H., NIU, Y., LOU, Y. & WANG, H. (2020), The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens. Frontiers in Immunology 11: 576622.

FENIZIA, C., GALBIATI, S., VANETTI, C., VAGO, R., CLERICI, M., TACCHETTI, C. & DANIELE, T. (2021), SARS-CoV-2 Entry: At the Crossroads of CD147 and ACE2. Cells 10(6): 1434.

GALAY, R.L., UMEMIYA-SHIRAFUJI, R., BACOLOD, E.T., MAEDA, H., KUSAKISAKO, K., KOYAMA, J., TSUJI, N., MOCHIZUKI, M., FUJISAKI, K. & TANAKA, T. (2014), Two Kinds of Ferritin Protect Ixodid Ticks from Iron Overload and Consequent Oxidative Stress. PloS One 9(3): e90661.

GANESH, B., RAJAKUMAR, T., MALATHI, M., MANIKANDAN, N., NAGARAJ, J., SANTHAKUMAR, A., ELANGOVAN, A. & MALIK, Y.S. (2021), Epidemiology and Pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in Comparison with SARS, MERS: An Updated Overview of Current Knowledge and Future Perspectives. Clinical Epidemiology and global health 10: 100694.

GEORGIEVA, E., ANANIEV, J., YOVCHEV, Y., ..., KOLEVA-KORKELIA, I., TSONEVA, V. & NIKOLOVA, G. (2023), COVID-19 Complications: Oxidative Stress, Inflammation, and Mitochondrial and Endothelial Dysfunction. International Journal of Molecular Sciences 24(19): 14876.

GOMES, S.M.R., BRITO, A.C.S., MANFRO, W.F.P., ..., DA SILVA, S.A.G., DUTRA, P.M.L. & RODRIGUES, L.S. (2023), High Levels of Pro-Inflammatory SARS-CoV-2-Specific Biomarkers Revealed by In Vitro Whole Blood Cytokine Release Assay (CRA) in Recovered and Long-COVID-19 Patients. PloS One 18(4): e0283983.

GORKHALI, R., KOIRALA, P., RIJAL, S., MAINALI, A., BARAL, A. & BHATTARAI, H.K. (2021), Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. Bioinformatics and Biology Insights 15: 11779322211025876.

GUPTA, P., GUPTA, V., SINGH, C.M. & SINGHAL, L. (2023), Emergence of COVID-19 Variants: An Update. Cureus 15(7): e41295.

HAN, T., KANG, J., LI, G., GE, J. & GU, J. (2020), Analysis of 2019-nCoV Receptor ACE2 Expression in Different Tissues and Its Significance Study. Annals of Translational Medicine 8(17): 1077.

HOFFMANN. M., KLEINE-WEBER, H., SCHROEDER, S., ..., MÜLLER, M.A., DROSTEN, C. & PÖHLMANN, S. (2020), SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell 181(2): 271-280.e278.

HOOPER NIGEL, M., LAMBERT DANIEL, W. & TURNER ANTHONY, J. (2020), Discovery and Characterization of ACE2 – A 20-Year Journey of Surprises from Vasopeptidase to COVID-19. Clinical Science 134(18): 2489-2501.

KORN, S.M., DHAMOTHARAN, K., JEFFRIES, C.M. & SCHLUNDT, A. (2023), The Preference Signature of the SARS-CoV-2 Nucleocapsid NTD for Its 5'-Genomic RNA Elements. Nature Communications 14(1): 3331.

LABIOD, N., LUCZKOWIAK, J., TAPIA, M.M., LASALA, F. & DELGADO, R. (2023), The Role of DC-SIGN as a Trans-Receptor in Infection by MERS-CoV. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 13: 1177270.

LAPENNA, D. (2021), Antioxidant Therapy in Coronavirus Disease 2019: The Crucial Role of Early Treatment and Antioxidant Typology. Clinical Infectious Diseases 73(12): 2370-2371.

MALONE, B., URAKOVA, N., SNIJDER, E.J. & CAMPBELL, E.A. (2022), Structures and Functions of Coronavirus Replication–Transcription Complexes and Their Relevance for SARS-CoV-2 Drug Design. Nature Reviews Molecular Cell Biology 23(1): 21-39.

MIRABITO COLAFELLA, K.M., BOVÉE, D.M. & DANSER, A.H.J. (2019), The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Its Therapeutic Targets. Experimental Eye Research 186: 107680.

PARSONS, R.J. & ACHARYA, P. (2023), Evolution of the SARS-CoV-2 Omicron Spike. Cell Reports 42(12): 113444.

PEACOCK, T.P., GOLDHILL, D.H., ZHOU, J., ..., DAVIDSON, A.D., MATTHEWS, D.A. & BARCLAY, W.S. (2021), The Furin Cleavage Site in the SARS-CoV-2 Spike Protein Is Required for Transmission in Ferrets. Nature Microbiology 6(7): 899-909.

PEROTTET, J., GONDOLF, C., GRANDHOMME, F., CREVEUIL, C. & ALLOUCHE, S. (2022), Ferritin as a Predictive Biomarker of Severity in COVID-19. Annales de Biologie Clinique 80(4): 363-368.

POLATOĞLU, I., ONCU-ONER, T., DALMAN, I. & OZDOGAN, S. (2023), COVID-19 in Early 2023: Structure, Replication Mechanism, Variants of SARS-CoV-2, Diagnostic Tests, and Vaccine & Drug Development Studies. MedComm 4(2): e228.

POUDEL, S., ISHAK, A., PEREZ-FERNANDEZ, J., ..., ROMANÍ, L., BONILLA-ALDANA, D.K. & RODRIGUEZ-MORALES, A.J. (2021), Highly Mutated SARS-CoV-2 Omicron Variant Sparks Significant Concern among Global Experts – What Is Known so Far? Travel Medicine and Infectious Disease 45: 102234.

SAKR, Y., GIOVINI, M., LEONE, ..., BUSCHBECK, S., RANIERI, V.M. & ANTONUCCI, E. (2020), Pulmonary Embolism in Patients with Coronavirus Disease-2019 (COVID-19) Pneumonia: A Narrative Review. Annals of Intensive Care 10(1): 124.

SANTOS-MENDOZA, T. (2023), The Envelope (E) Protein of SARS-CoV-2 as a Pharmacological Target. Viruses 15(4): 1000.

SAVLA, S.R., PRABHAVALKAR, K.S. & BHATT, L.K. (2021), Cytokine Storm Associated Coagulation Complications in COVID-19 Patients: Pathogenesis and Management. Expert Review of Anti-infective Therapy 19(11): 1397-1413.

SCHOEMAN, D. & FIELDING, B.C. (2020), Is There a Link between the Pathogenic Human Coronavirus Envelope Protein and Immunopathology? A Review of the Literature. Frontiers in Microbiology 11: 2086.

SENDER, R., BAR-ON, Y.M., GLEIZER, ..., FLAMHOLZ, A., PHILLIPS, R. & MILO, R. (2021), The Total Number and Mass of SARS-CoV-2 Virions. Proceedings of the National Academy of Sciences 118(25): e2024815118.

SZILVESZTER, M., PÁL, S., SIMON-SZABÓ, Z., AKÁCSOS-SZÁSZ, O.Z., ..., FAUST, Z., TILINCA, M.C. & NEMES-NAGY, E. (2023), The Management of COVID-19-Related Coagulopathy: A Focus on the Challenges of Metabolic and Vascular Diseases. International Journal of Molecular Sciences 24(16): 12782.

TAM, D., LORENZO-LEAL, A.C., HERNÁNDEZ, L.R. & BACH, H. (2023), Targeting SARS-CoV-2 Non-Structural Proteins. International Journal of Molecular Sciences 24(16).

THACHIL, J. (2016), The Beneficial Effect of Acute Phase Increase in Serum Ferritin. European Journal of Internal Medicine 35: e16-e17.

THOMAS, S. (2020), The Structure of the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Resembles the Sugar Transporter Semisweet. Pathogens & Immunity 5(1): 342-363.

TRUMAN-ROSENTSVIT, M., BERENBAUM, D., SPEKTOR, L., GLASER, F., ROUAULT, T.A. & MEYRON-HOLTZ, E.G. (2018), Ferritin Is Secreted via 2 Distinct Nonclassical Vesicular Pathways. Blood 131(3): 342-352.

ULLRICH, S. & NITSCHE, C. (2020), The SARS-CoV-2 Main Protease as Drug Target. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 30(17): 127377.

VERAS, F.P., PONTELLI, M.C., SILVA, C.M, ..., LOUZADA-JUNIOR, P., OLIVEIRA, R.D. & CUNHA, F.Q. (2020), SARS-CoV-2-Triggered Neutrophil Extracellular Traps Mediate COVID-19 Pathology. The Journal of Experimental Medicine 217(12): e20201129.

WANG, W., KNOVICH, M.A., COFFMAN, L.G., TORTI, F.M. & TORTI, S.V. (2010), Serum Ferritin: Past, Present and Future. Biochimica et Biophysica Acta 1800(8): 760-769.

WILLIAMS, D.M., HORNSBY, H.R., SHEHATA, O.M., ..., BROWN, S., DE SILVA, T.I. & PEDEN, A.A. (2023), Establishing SARS-CoV-2 Membrane Protein-Specific Antibodies as a Valuable Serological Target via High-Content Microscopy. iScience 26(7): 107056.

WU, C., ZHENG, M., YANG, Y., ..., ZHANG, Y., CHEN, L. & LI, H. (2020), Furin: A Potential Therapeutic Target for COVID-19. iScience 23(10): 101642.

WU, W., CHENG, Y., ZHOU, H., SUN, C. & ZHANG, S. (2023), The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein: Its Role in the Viral Life Cycle, Structure and Functions, and Use as a Potential Target in the Development of Vaccines and Diagnostics. Virology Journal 20(1): 6.

XIA, X. (2021), Domains and Functions of Spike Protein in SARS-CoV-2 in the Context of Vaccine Design. Viruses 13(1): 109.

ZHU, N., ZHANG, D., WANG, W., ..., WU, G., GAO, G.F. & TAN, W. (2020), A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. The New England Journal of Medicine 382(8): 727-733.

Capítulo XIX

Desarrollo de agentes antivirales: coronavirus y la COVID-19. Estado de la situación

José Manuel Vega Pérez
Académico de número de la Academia Iberoamericana de Farmacia.
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla

INTRODUCCIÓN

Se recoge en este capítulo una panorámica de la investigación químico-farmacéutica sobre el desarrollo de antivirales dirigidos al virus SARS-CoV-2, responsable de la enfermedad denominada COVID-19, tal como se presenta a finales de 2021. Se trata de la búsqueda de moléculas pequeñas dirigidas a dianas víricas, tales como las importantes proteínas con actividad ARN polimerasa y proteasas, para usarlas en la fase inicial de la enfermedad, denominada fase vírica, y supone una investigación independiente de la del desarrollo de vacunas y anticuerpos.

Desde el punto de vista taxonómico, y siguiendo el método de Baltimore (1971) que agrupa a los virus según su tipo de genoma (ADN, ARN, monocatenario o bicatenario etc.) y su método de replicación, los coronavirus que infectan a humanos, pertenecen al Grupo IV (virus ARN monocatenario positivo), familia, *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae,* género *Betacoronavirus*.

Hasta ahora se conocen siete coronavirus que infectan a los seres humanos. Tres de ellos causan enfermedades graves: el primero, denominado **SARS-CoV** (*severe acute respiratory syndrome coronavirus*, traducido como coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave, ocasionalmente llamado SARS-CoV-1), conocido en 2002; el segundo, **MERS-CoV** (*Middle East respiratory syndrome* (MERS)-CoV, coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio, también denominado como EMC/2012, HCoV-EMC/2012), descubierto en 2012 y el tercero, el **SARS-CoV-2** (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave, inicialmente, 2019-nCoV, *2019-novel coronavirus*), conocido en 2019, que es el coronavirus causante de la enfermedad por coronavirus de 2019, **COVID-19.** Los otros cuatro, conocidos como **HCoV-HKU1**, **HCoV-NL63**, **HCoV-OC43** y **HCoV-229E** son menos virulentos y solo producen síntomas menores, del tipo de resfriados comunes (Andersen *et al.* 2020; V'koski *et al.* 2021). En el grupo IV de la clasificación de Baltimore (virus ARN monocatenario positivo) se encuentra también la familia *Picornaviridae*, en la que se incluyen los géneros enterovirus y rinovirus; la pertenencia al mismo grupo que los coronavirus justifica el que puedan presentar ciertas homologías genéticas, útiles para el descubrimiento de antivirales, como apreciaremos más adelante.

El abordaje terapéutico de la enfermedad COVID-19 es difícil a pesar del esfuerzo investigador a nivel mundial sin precedentes que se está realizando. Una de las razones es que el desarrollo de la enfermedad es complejo y supone, al menos en los casos más graves que suelen terminar dramáticamente, tres etapas, que evolucionan desde la exclusivamente vírica inicial, pasando por una fase clínica respiratoria, hasta una hiperinflamatoria, caracterizada por lo que se denomina tormenta de citoquinas y que suponen la necesidad de considerar distintos abordajes terapéuticos, tal como se presenta en la figura 1 (Siddiqi y Mehra 2020).

La etapa III es alcanzada, por cuestión de factores de riesgo y/o predisposición genética, por una minoría de pacientes; es la más grave y supone un alto riesgo de mortalidad. La terapia para esta fase III se apoya en el uso de agentes inmunomoduladores para reducir la inflamación sistémica antes de que se produzcan fallos

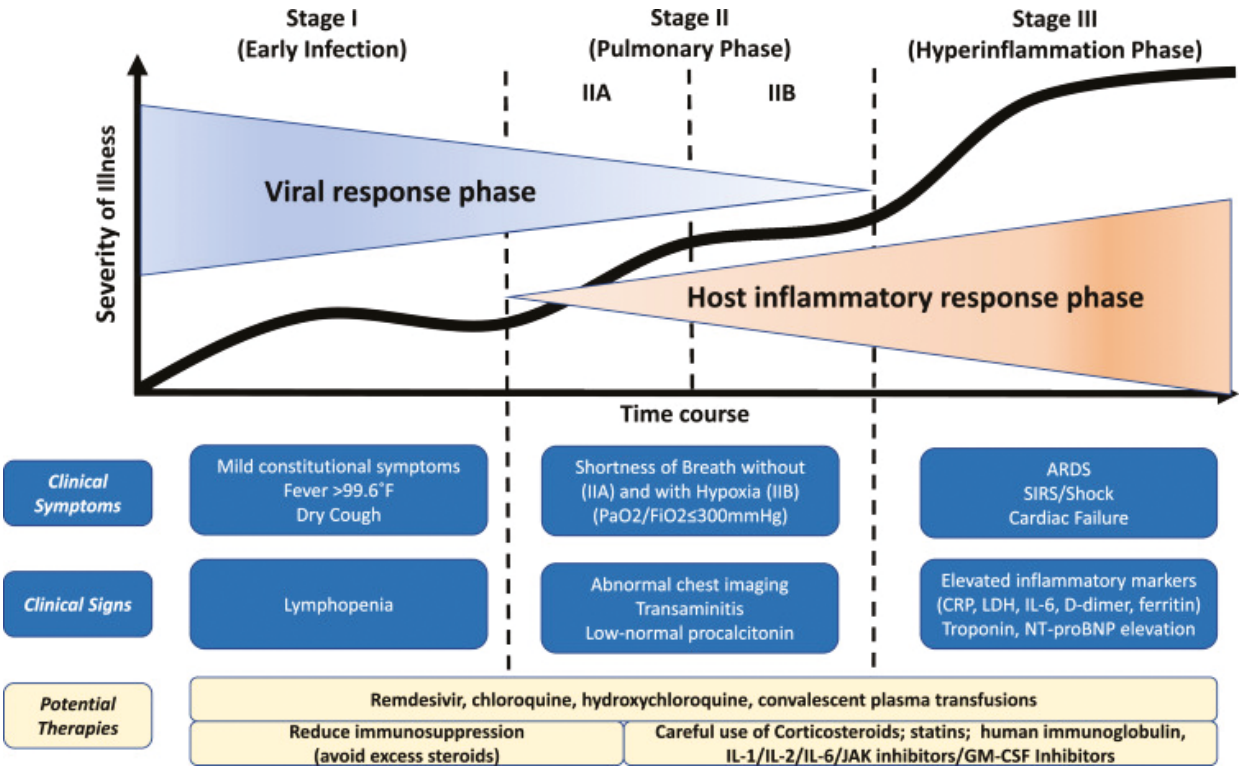


Figura 1. Etapas y sintomatologías de la COVID-19

multiorgánicos. Se propone un uso potente de corticoides, especialmente dexametasona, junto a inhibidores de citoquinas como el tocilizumab (inhibidor de IL-6) o anakinra (antagonista del receptor de IL-1). En este sentido hay que destacar el potente ensayo clínico Solidarity, impulsado por la OMS en 2020, realizado en docenas de países de todo el mundo y que, en su segunda fase, está evaluando el potencial uso para el tratamiento de la COVID-19 de tres fármacos ya conocidos con prescripciones diferentes, el anticanceroso imatinib, el antimalárico artesunato y el infliximab, usado en el tratamiento de ciertas enfermedades del sistema inmune. Han sido seleccionado de un amplio panel previo de numerosos compuestos donados por las empresas farmacéuticas (Metha *et al.* 2020; Kupferschmidt 2021) Asimismo, el fármaco EXO-CD24, que se basa en una fórmula innovadora basada en exosomas enriquecidos con CD24, desarrollado en Israel presenta prometedores resultados en pacientes con COVID-19 grave o moderado; se trata de un inmunoregulador que interviene en el mecanismo responsable del desencadenamiento de la tormenta de citoquinas (NCT, 04902183).

1. EL VIRUS

El SARS-CoV-2 es un virus ARN de polaridad positiva, lo que permite la traducción directa del genoma usando los ribosomas de la célula huésped inmediatamente después de la entrada en la célula; su genoma codifica 29 proteínas víricas.

La figura 2 (Wu *et al.* 2020) esquematiza la estructura del SARS-CoV-2 y señala las proteínas estructurales claves. La proteína **S**, *spike*, responsable de la unión a la célula huésped y su posterior fusión; las proteínas **M** (membrana) y **E** (*envelope*, envoltura) que mantienen la estructura del virión; la proteína **N** (nucleocápsida) empaqueta el genoma viral de ARN monocatenario. Además, la **HE**, hemaglutinina con actividad esterasa, asiste a la proteína S para facilitar la entrada.

La proteína S, espiga, *spike*, es, como se ha comentado, la responsable de la unión del coronavirus a su proteína diana, que se halla en la superficie de la célula que va a hospedarlo. En el caso de SARS-CoV y de SARS-CoV-2 la proteína S interviene en dos pasos esenciales: en primer lugar, se enlaza a la proteína transmembranal con actividad enzimática **ACE2**, por su extremo amino terminal y, en segundo lugar, promueve la fusión entre las membranas víricas y celular a través del extremo carboxílico terminal. ACE2 es conocida por su papel de contrapeso de los efectos de la ACE en el sistema cardiovascular. ACE convierte la angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido que muestra actividad vasopresora y proinflamatoria. La actividad carboxipeptidasa de ACE2 convierte la angiotensina II en el heptapéptido angiotensina (1-7) con actividad opuesta a angiotensina II. ACE II está ampliamente distribuida en el organismo, pero abunda especialmente

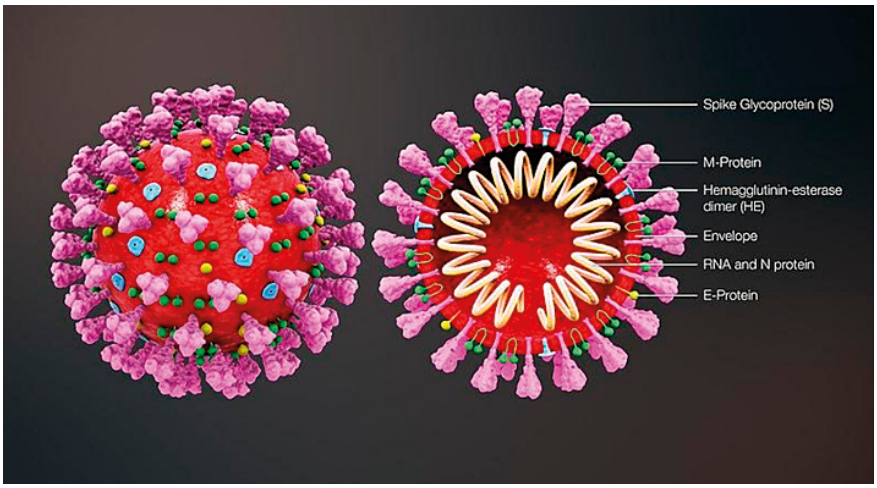


Figura 2. Estructura esquemática del SARS CoV-2

en los pulmones lo que explica el tropismo que exhiben el coronavirus hacia ellos. Las diferencias en estructura y función de la proteína S en SARS-CoV y SARS-CoV-2 hacen que en este último la afinidad de la proteína por la ACE2 sea mayor explicándose así la mayor velocidad de transmisión de SARS-CoV-2 respecto al SARS-CoV responsable del síndrome SARS clásico (Andersen *et al.*; Matheson y Lehner 2020). El otro coronavirus relevante clínicamente en humanos, MERS-CoV, une su proteína S a una diana distinta, la dipeptidil peptidasa 4, DPP4, con actividad también de proteasa, muy difundida en el organismo y, también, presente en los pulmones.

El conocimiento de la estructura del virus ha ido permitiendo el desarrollo de terapias dirigidas directamente hacia él. El genoma del SARS-CoV-2 se ha descifrado en tiempo récord y puesto a disposición de los investigadores de todo el mundo; el desarrollo de vacunas ha centrado gran parte de este notable esfuerzo investigador. En este sentido, las vacunas, cuyo desarrollo comenzó muy pronto, y que en todos los casos usan a la proteína espiga, S, *spike*, como diana antigénica, han permitido el inicio de la vacunación a principios de 2021. Las tres primeras usadas masivamente en todo el mundo han sido puestas a punto por Pfizer y Moderna, que utilizan la novedosa técnica del ARN mensajero, es decir que porta el ARN mensajero para la expresión del antígeno, y por Astra Zeneca, que utiliza como vector otro virus, concretamente un adenovirus, modificado para contener el gen responsable de la formación de la proteína antigénica. El desarrollo de vacunas mediante la aproximación del ARN mensajero puede suponer un antes y un después en el devenir de las vacunas, así como una nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de otras enfermedades, como el cáncer (Dolgin 2021; Chaudhay *et al.* 2021). En octubre de 2023, Drew Weissman y Katalin Karikó, dos de los científicos implicados en el desarrollo de este tipo de vacunas, han sido galardonados con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina por su contribución decisiva al desarrollo de las mismas.

La proteína S del SARS-CoV-2, además de su potencial antigénico, clave para el desarrollo de las vacunas, ofrece la oportunidad del desarrollo de antivirales directos explotando su mecanismo de activación. Este es un proceso complejo que requiere las rupturas proteolíticas de S, rupturas que son catalizadas por proteasas celulares *humanas*. La entrada del virus depende del enlace (*binding*) de la subunidad S1 de la proteína al receptor celular, mientras que la subunidad S2 se ancla a la membrana y facilita la fusión (fig. 3) (Hoffmann *et al.* 2020; Scudellari 2021).

Las proteasas de la célula huésped que, al promover las escisiones en S comentadas, juegan un papel relevante en la activación de diferentes coronavirus, son una serín proteasa denominada TMPRSS2 (serín proteasa transmembranal de tipo 2) y un tipo de proteasa denominado furina. Los datos obtenidos hasta ahora sugieren que la furina cataliza la escisión S1/S2 y TMPRSS2 la ruptura en S2' (Bestle *et al.* 2020). El papel relevante que

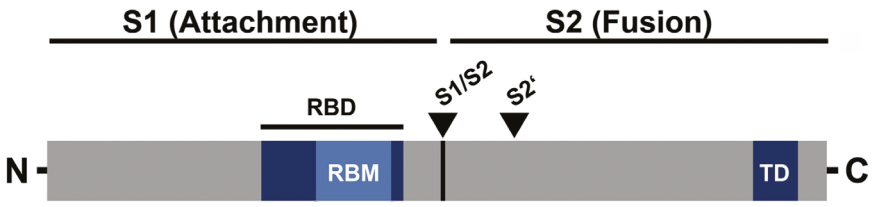


Figura 3. Ilustración esquemática de la proteína S del SARS-CoV-2

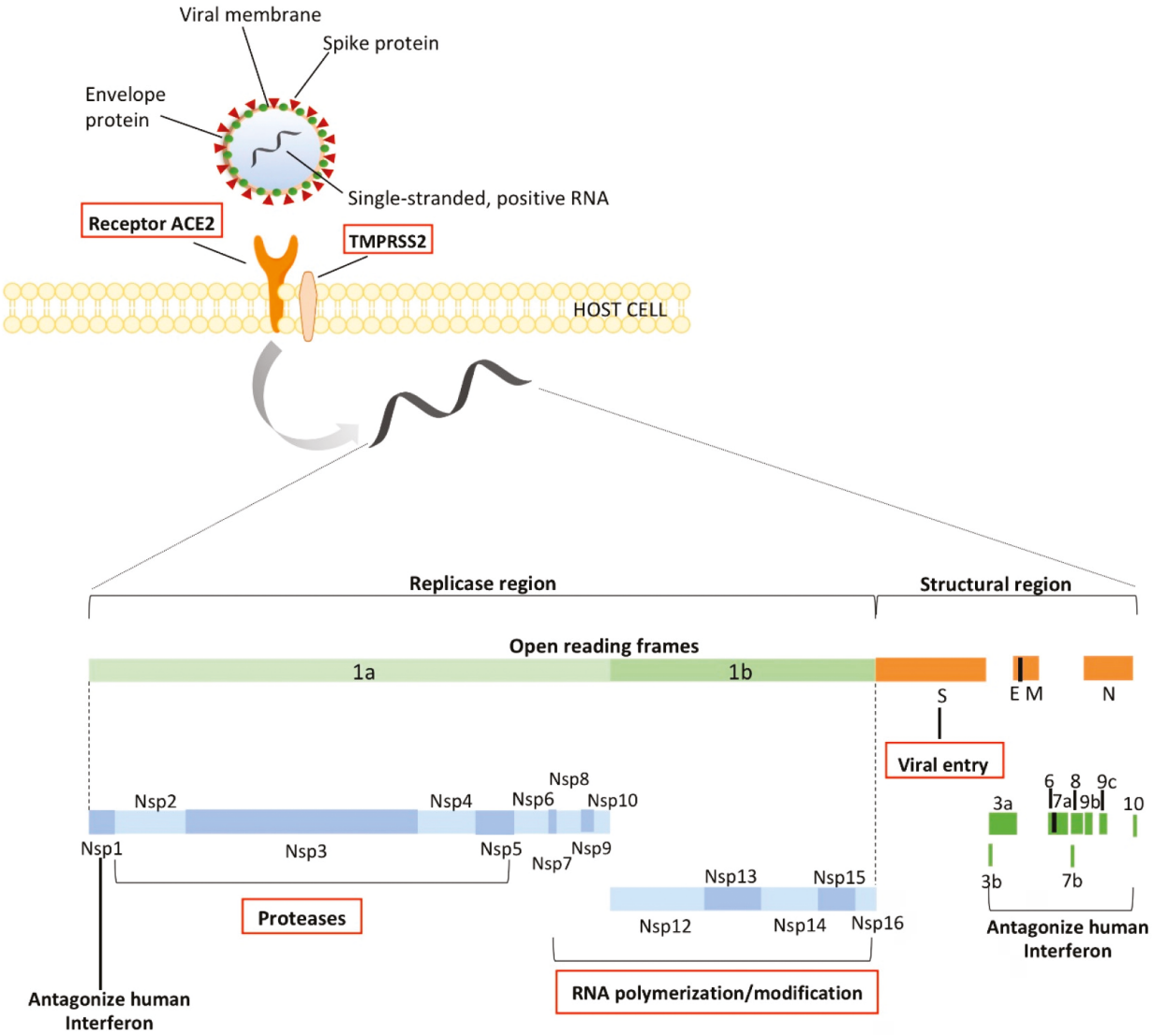


Figura 4. Representación del SARS-CoV-2, la entrada del virus y traducción genómica

juegan en la entrada del virus a la célula las convierte en diana claves para la búsqueda de inhibidores enzimáticos de molécula pequeña. Se trata, recordemos, de dianas no víricas, humanas.

Por otra parte, las 16 proteínas no estructurales (Zhao *et al.* 2021), NS, juegan el papel vírico esencial habitual relacionadas con sus actividades proteasa, ARN polimerasa, helicasa, que se conocen en otros virus. Entre ellas destacan la proteína no estructural, nsp3, proteasa relacionada con la papaína (*papain-like protease*, simbolizada como PL^{pro}), nsp5, la denominada proteasa principal (*main*, simbolizada como M^{pro}), relacionada con la quimiotripsina (*3CL protease, 3-chymotrysin-like protease,* y por eso también simbolizada como $3CL^{pro}$ en el caso de los coronavirus) y nsp12, la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp), que son potenciales dianas para el desarrollo de agentes anti SARS-CoV-2 (Matheson y Lehner 2020).

En la figura 4 se muestra una representación esquemática del virión, su entrada en la célula huésped, la traducción genómica y el procesado de la poliproteína inicial que supone la generación de las proteínas claves para la replicación viral (Cannalire *et al.* 2022) se señala cómo algunas proteínas virales suprimen la respuesta inmunitaria del huésped.

Desde el punto de vista estrictamente vírico de la COVID-19, y con el objetivo de buscar antivirales, el estudio de todas estas proteínas, estructurales y no estructurales está en el centro de numerosas investigaciones en todo el mundo con el fin de buscar vacunas como hemos visto, o para su consideración como posibles dianas farmacológicas útiles para el desarrollo de agentes antivirales de molécula pequeña, que actúen directamente (DAAs) frente al SARS-CoV-2 y puedan ser usados en las primeras etapas de la infección. Con este último fin destacan como dianas que están actualmente en el centro

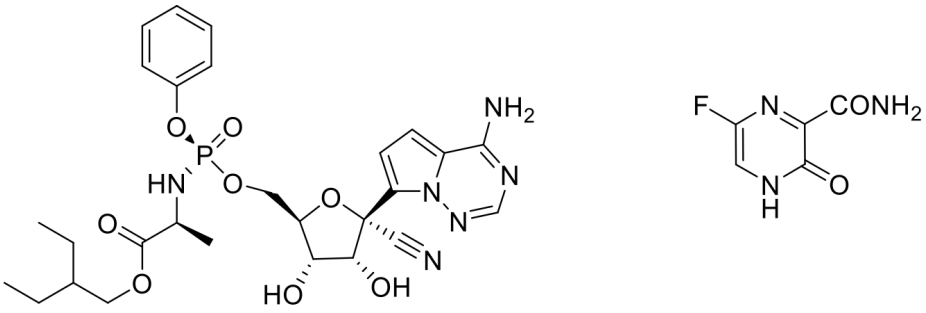


Figura 5. Estructuras del Remdesivir y Fapiravir

Remdesivir

Favipiravir

de la investigación, la polimerasa (RdRp) y la denominada proteasa principal (3CL^{pro}, o M^{pro}), por sus relevantes funciones en las etapas intracelulares del ciclo de vida viral, por ser las mejor caracterizadas y mostrar el mayor grado de conservación en los diferentes coronavirus, lo que puede permitir la identificación de inhibidores de amplio espectro (Cannalire *et al.* 2020).

Por otra parte, la búsqueda de fármacos antivirales específicamente dirigidos al SARS-CoV-2, dada la urgencia impuesta por la pandemia, se ha centrado inicialmente (y es lo que inmediatamente ha trascendido a medios especializados o de información general) en el posible uso contra este virus de algunos agentes de actividad contrastada frente a otros virus relacionados o incluso, como se ha apuntado antes, de fármacos que actúan frente a dianas diferentes a las víricas; se trata de una estrategia de reutilización (*repurposing*) o reposicionamiento *(repositioning*) (Gordon *et al.* 2020). Este abordaje inmediato, que ofrece la gran ventaja de introducir en clínica, de manera rápida, fármacos ya conocidos por su seguridad en humanos, parece lógico, dada la urgencia del momento, aunque pronto se ha empezado a trabajar también en una estrategia más calmada dirigida a la búsqueda de **nuevas moléculas** que sean activas frente a las dianas (*targets*) que específicamente expresa el propio coronavirus.

2. ANTIVIRALES DE MOLÉCULA PEQUEÑA. LA POLIMERASA RDRP COMO DIANA

La polimerasa RdRp es una diana valiosa debido al papel central que juega en la síntesis de ARN vírico, a la falta de homología con proteínas del huésped y al alto grado de conservación que presenta su secuencia estructural entre los diferentes tipos de coronavirus (Zhao *et al.* 2021).

Dentro de la estrategia de reutilización para la COVID-19 destacan en este caso los agentes **Remdesivir** y **Favipiravir**, cuyas estructuras se presentan en la figura 5.

El Remdesivir, desarrollado por Gilead Sciences, GS-5734, es un profármaco de la familia de los monofosfatos derivados de análogos de nucleósidos. Investigado por su actividad contra el virus del Ébola, pronto fue considerado como un prometedor agente para el tratamiento de la COVID-19. Ha mostrado potente actividad *in vitro* contra varios coronavirus, incluyendo SARS-CoV-2, con valores de EC_{50} y EC_{90} de 0,77 μM y 1,76 μM, respectivamente (Eastman 2020). En este sentido, es de destacar las conclusiones de un trabajo de 2020 hecho en base a un gran ensayo clínico sobre el Remdesivir y la COVID-19: «los resultados apoyan el uso de remdesivir para pacientes con COVID-19 que requieren terapia con oxígeno; sin embargo es claro que el tratamiento con un antiviral solo no parece suficiente y futuras estrategias deben evaluar la combinación con otras aproximaciones terapéuticas o con otros agentes antivirales» (Eastman *et al.* 2020; Beigel *et al.* 2020). A finales de junio de 2020 la Agencia Europea del Medicamento da luz verde al Remdesivir como primer tratamiento autorizado para la COVID-19 en adultos y adolescentes a partir de 12 años de edad con neumonía y necesitados de respiración asistida en régimen hospitalario (EMA 2021). Por las razones expuestas y la necesidad de administración intravenosa es un tratamiento que se lleva a cabo en régimen hospitalario; la FDA lo aprueba en octubre de 2020.

Se ha demostrado que en la actividad polimerasa de la proteína no estructural nsp12 del coronavirus es esencial la actividad como cofactores de las proteínas no estructurales nsp7 y nsp8, dado que forman un complejo que es clave para la actividad polimerasa (Kirchdoerfer y Ward 2019). La forma activa del remdesivir, generada *in vivo*, es el trifosfato del análogo nucleosídico, cuya estructura se presenta en la figura 6, compite con el sustrato natural, el ATP, habiendo evidencias que sugieren que se incorpora más eficientemente que el propio ATP (Gordon *et al.* 2020).

Una vez incorporado, el inhibidor causa una parada de la síntesis de ARN en la posición i + 3. Los tres nucleótidos adicionales incorporados pueden ser la causa que protege al inhibidor de su expulsión vía escisión por la exonucleasa 3-5 vírica, enzima que actúa como correctora de errores que se pueden producir en la cadena

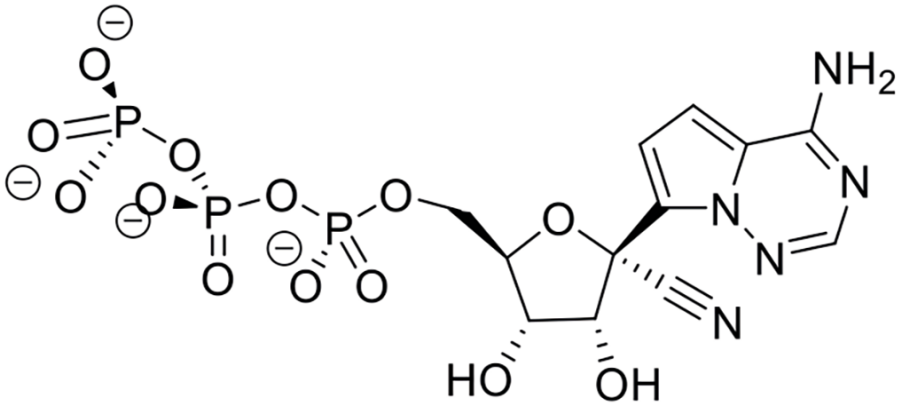
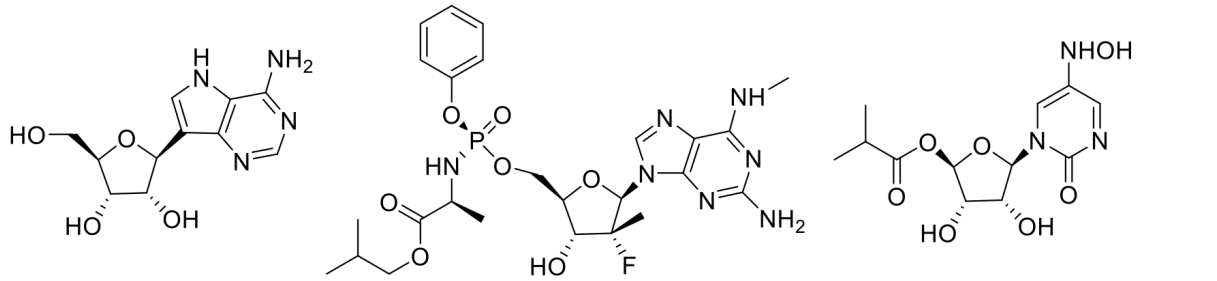


Figura 6. Estructura de la forma activa del Remdesivir



Galidesivir BCX-4430 Bemnifosbuvir AT-527 Molnupiravir MK-4482/EIDD-2801

Figura 7. Estructuras de Galidesivir, Bemnifosbuvir y Molnupiravir

de polinucleótidos que se va formando (Agostini *et al.* 2020). Tomados en conjunto estos datos pueden explicar la alta potencia que el remdesivir exhibe frente a virus ARN en ensayos celulares (ASBMB, n.d.).

Una situación análoga ocurre con el Favipiravir, T-705, activo frente a polimerasas de virus ARN, presentando una actividad *in vitro* frente al SARS-CoV-2 de 61,88 mM. A finales de mayo de 2020 fue noticia relevante en los medios de todo el mundo la información sobre un posible lanzamiento a nivel mundial por parte de Rusia de un medicamento, el **Avifavir**, basado en el Favipiravir, del que se cita expresamente su procedencia japonesa.

De entre los numerosos inhibidores de la polimerasa, que en el marco de la estrategia de reposicionamiento se están considerando para su posible uso contra el SARS-CoV-2 destacan el **Galidesivir**, BCX-4430, desarrollado por BioCryst Pharmaceuticals y aprobado por la FDA en 2020 para el tratamiento de enfermedades provocadas por diversos virus ARN; el **Bemnifosbuvir** (AT-527), de Atea Pharmaceuticals y desarrollado clínicamente por Roche. Se trata de un nuevo profármaco inicialmente desarrollado para la hepatitis C que es un potente Inhibidor of SARS-CoV-2 *in vitro*; es un prometedor antiviral oral para el tratamiento de COVID-19 del que se espera los resultados de los ensayos clínicos; y, sobre todo, el **Molnupiravir**, MK-4482/EIDD-2801, **Lagevrio®**, activo frente a numerosos virus ARN, fue inicialmente desarrollado por científicos de la universidad de Emory (Atlanta), a través de la empresa DRIVE (*Drug Innovation Ventures at Emory*) y, posteriormente, adquirido por Ridgeback Biotherapeutics, Miami, asociada para su desarrollo con Merck. Sus estructuras se recogen en la figura 7.

En octubre de 2021 se conocieron los prometedores resultados de un ensayo clínico Fase III de Molnupiravir. Posteriormente, su uso, mediante administración oral, ha sido aprobado en determinadas condiciones para el tratamiento de la COVID-19 por las diferentes agencias regulatorias: el 19 de noviembre de 2021, por la EMA y el 21 de diciembre de 2021, por la FDA.

Como se ha indicado, Redemsivir (GS-5734), es un profármaco de la familia de los monofosfatos desarrollado con el objetivo de facilitar la fosforilación inicial y las propiedades farmacocinéticas del análogo de nucleósido prototipo, GS-441524 (fig. 8). Recientemente, se ha abordado directamente la mejora de este análogo por grupos de origen chino, habiéndose desarrollado por las empresas Shanghai Junshi Biosciences Co., Ltd, Shanghai Juntop Biosciences Co., Ltd. y Vigonvita Life Sciences Co., Ltd un nuevo derivado, el VV-116, Deuremidevir para el tratamiento oral de la COVID-19. El punto de partida considera las limitaciones que presenta el Remdesivir, como son la necesidad de su administración intravenosa y su

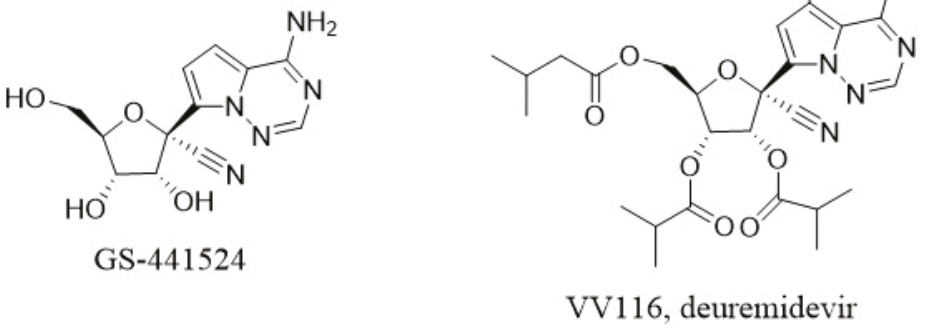


Figura 8. Estructuras de GS-441524 y VV116

no contrastada eficacia real sistemática, puesta de manifiesto en diversos ensayos clínicos (Y. Xie *et al.* 2021; Cao, Z. *et al.* 2023). Dado que GS-441524 es el metabolito más importante de remdesivir cuando se administra por vía intravenosa y que presenta claras propiedades inhibitorias de la polimerasa del SARS-CoV-2, esta investigación trata de su optimización. Notablemente, de entre los compuestos estudiados, destaca la mejora que se obtiene en la capacidad inhibitoria (EC50 = 0,39 μM) con la introducción de un átomo de deuterio en la posición 7, realizada con el objetivo de mejorar sus propiedades farmacocinéticas (Zhang *et al.* 2022) La optimización farmacocinética final llega de la mano de la conversión en profármaco para llegar a VV116, Duremidevir (fig. 4). En enero de 2023 ha sido aprobado por el organismo regulador de China (NMPA) para el tratamiento oral de la COVID-19.

3. ANTIVIRALES DE MOLÉCULA PEQUEÑA. EL CASO DE LA *PROTEASA PRINCIPAL* DEL CORONAVIRUS

A pesar del esfuerzo investigador que, sucintamente, se ha presentado aquí, a mediados de julio de 2021 el tratamiento recomendado para casos graves de COVID-19 se reducía a dexametasona, remdesivir y tocilizumab (Stockman *et al.* 2006, NIH 2021) solos o en combinación, tratamientos que, además, no son apropiados para pacientes en fase tempranas de la infección o en profilaxis. La proteasa principal, $3CL^{pro}$ se ha considerado la diana principal y más prometedora para el desarrollo de antivirales específicos del SARS-CoV-2, debido al papel clave en la replicación viral que dicha proteína juega. Inicialmente y dentro de la estrategia de reutilización o reposicionamiento, la asociación **Lopinavir/Ritonavir**, inhibidores de la proteasa del HIV, se ha mostrado como una opción de tratamiento viable, después de mostrar sesgos terapéuticos favorables en diferentes ensayos clínicos con pacientes con SARS-CoV y SARS-CoV-2 (Ye *et al.* 2020). Esta asociación (Kaletra®), que explota el efecto sinérgico que produce una baja dosis de ritonavir, que inhibe la inactivación metabólica del lopinavir (Bolcato *et al.* 2020), actuando así como potenciador farmacocinético, no ha conseguido, hasta el momento validar su eficacia clínica definitivamente (Banerjee *et al.* 2021). Posteriormente, diferentes estudios señalan como diana real de estos compuestos a la proteasa principal $3CL^{pro}$ (Banerjee *et al.* 2021).

La búsqueda de nuevos agentes dirigidos específicamente a esta importante diana ($3CL^{pro}$, M^{pro}) se ha visto facilitada por la rápida elucidación de su estructura, logro científico realizado pocas semanas después del comienzo de la pandemia. Este conocimiento ha permitido el acopio de datos que permite un abordaje racional de la búsqueda de inhibidores específicamente dirigidos a este importante enzima. En lo que sigue se presenta el estado, a comienzos de 2022, de las investigaciones sobre esta diana; hay numerosos compuestos en desarrollo habiéndose aprobado el uso clínico de un compuesto nuevo.

Entre los rasgos estructurales de M^{pro} destacan los siguientes. En primer lugar, se trata de una cisteína-proteasa (cisteín o cisteinil proteasa), nombre que hace alusión al papel decisivo que juega un residuo de cisteína, al poner en juego su capacidad nucleofílica, en el proceso catalítico; en nuestro caso se trata del residuo Cys145. Es también clave el residuo de histidina, His41, por su papel ácido/base; ambas forman la denominada díada (*dyad*) catalítica, tal como se recoge en la figura 9 (Cannalire *et al.* 2020; Banerjee *et al.* 2021).

En segundo lugar, la caracterización estructural de la proteasa principal del SARS-CoV-2 ha revelado que comparte un 96,1 % de su secuencia con la del SARS-CoV, lo que pone de manifiesto una arquitectura del sito catalítico altamente conservada (Banerjee *et al.* 2021). Este hecho conduce a una gran especificidad por sus sustratos, que son las zonas de corte, al menos 11, de la poliproteína inicial (Cannalire *et al.* 2020) y cuyas características estructurales está, asimismo, muy conservada; esto ha permitido conectar la investigación sobre los inhibidores

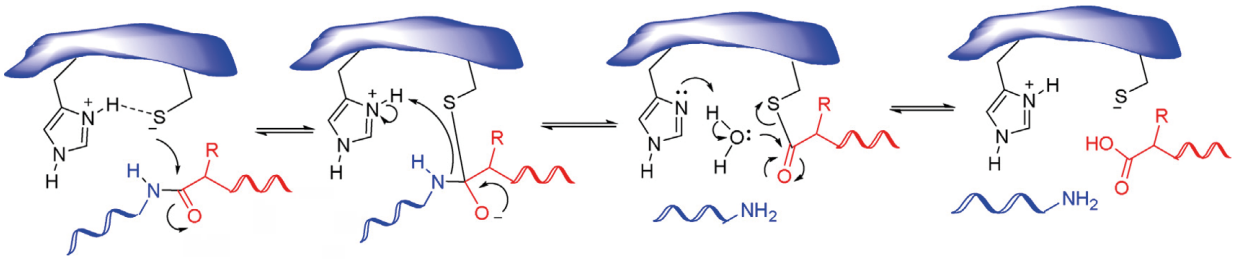


Figura 9. Mecanismo de acción de cisteinil proteasas (Banerjee *et al.* 2021)

de las proteasas de los dos coronavirus, y aprovechar los conocimientos adquiridos en el caso del SARS-CoV para el SARS-CoV-2.

Usando el conocido sistema de nomenclatura para las proteasas de Schechter y Berger (Papain *et al.* 1967), M^{pro} reconoce como sustratos sobre todo residuos en el rango de **P4 a P1'**; ocurriendo la reacción de hidrólisis entre los residuos P1 (NH) y P1'(CO). La especificidad está sobre todo determinada por la tríada P2-P1-P1' que muestra el mayor grado de conservación entre todos los sitios de corte, destacando el hecho notable de la presencia de **glutamina** (Gln) como P1 en todos ellos. P2 es un residuo hidrófobo con claro predominio de leucina (Leu) y P1' residuos pequeños como alanina (Ala) o serina (Ser). El esquema general de la secuencia clave compartida, P2-P1-P1' es, por tanto, Leu-Gln-Ser (Ala, Gly). Este peculiar y casi absoluto requerimiento del residuo de Gln para P1 representa una especificidad desconocida en las proteasas humanas lo que aumenta el atractivo de esta proteína viral como diana ideal para el diseño de inhibidores selectivos y seguros (Cannalire *et al.* 2020; Ullrich y Nitsche 2020). Además, con respecto a P2 y con el fin de ayudar a un eficaz diseño de posibles inhibidores, se ha estudiado, a través de la síntesis y valoración de diferentes sustancias modelos, la preferencia de la proteasa $3CL^{pro}$ de SARS-CoV y de SARS-CoV-2 por el residuo situado en esa posición, encontrándose que, aunque hay una fuerte preferencia por Leu, este puede ser cambiado por otros residuos hidrofóbicos, incluso sin tener la estructura de aminoácidos naturales. En la figura 10 se muestra de forma esquemática la especificidad y similitud en los sitios de corte en los tres coronavirus (Ullrich y Nitsche 2020).

En tercer lugar, se ha encontrado que las proteasas $3CL^{pro}$ de SARS-CoV y de SARS-CoV-2 están estructuralmente relacionadas con la proteasa principal de los *Enterovirus* y *Rinovirus*, denominadas proteína o proteasa EV 3C y HRV 3C respectivamente, que también muestran una gran especificidad por la glutamina para el residuo P1 de sus sustratos. Como los enterovirus afectan a los humanos causando diversas enfermedades, su proteasa es la diana escogida desde hace tiempo para la búsqueda de

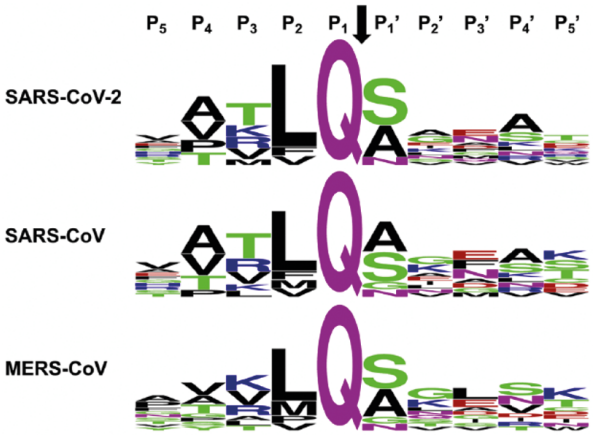


Figura 10. Esquema de la especificidad y similitud en los sitios de corte en los coronavirus (Ullrich y Nitsche 2020)

antivirales dirigidos a ellos, lo que ha generado un conjunto de conocimientos que han sido utilizados como línea de partida en la búsqueda de inhibidores de la proteasa principal de los coronavirus. De gran interés es la observación, surgida en la investigación sobre EV 3C y HRV 3C (proteasas de enterovirus y rinovirus) de que el ajuste en el sitio S1 se puede mejorar cambiando la cadena lateral del residuo de glutamina por una **lactama de cinco miembros**; la mayor rigidez del anillo facilita la calidad del ajuste, llegando a multiplicar por 10 la fuerza de la unión (*binding*), figura 11 (Matthews *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2020).

El análisis precedente trata de ajustar al máximo la capacidad de interacción de sustratos que puedan actuar como inhibidores efectivos de la proteasa; el paso siguiente es aumentar la capacidad inhibitoria mediante la posibilidad de formación de enlaces covalentes. Esto puede conseguirse cambiando una parte del sustrato del enzima por un residuo, denominado ahora *warhead*, a modo de brazo reactivo electrofílico. En el diseño de inhibidores específicos de este enzima se aprovecha el carácter de cisteinil proteasa del mismo y, por tanto, la existencia del residuo esencial Cys145, clave para la actividad enzimática del enzima. Se presenta el esquema de los requisitos estructurales de los sustratos, surgidos después

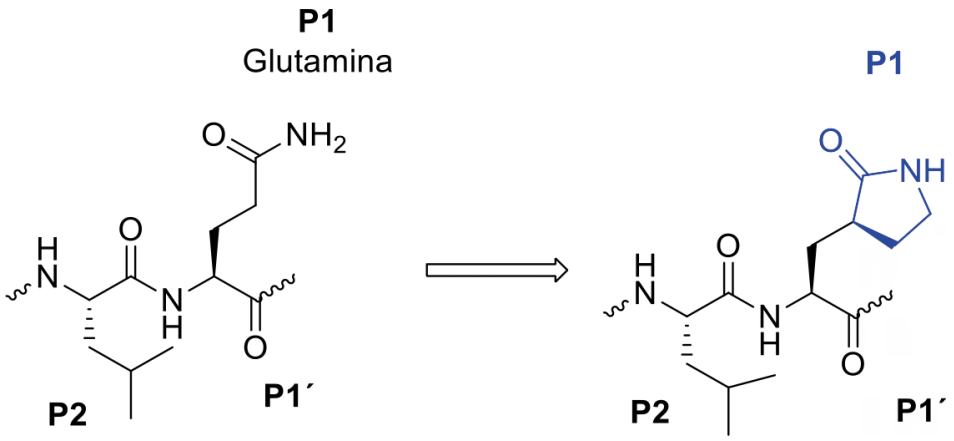


Figura 11. Evolución del residuo P1 en los candidatos a inhibidores

del exhaustivo análisis previo realizado con el fin de diseñar inhibidores de la proteasa principal (3CL^{pro}, M^{pro}), de los coronavirus a partir de los antecedentes citados, para conseguir nuevos antivirales (DAAs) eficaces, seguros y selectivos; las conclusiones fundamentales son:

1. **P1**, invariablemente es un residuo que porta un anillo lactámico pentagonal, que asegura potencia inhibitoria y selectividad frente a los sustratos de las proteasas humanas.
2. **P2** es un residuo de leucina que puede ser sustituido por otros residuos hidrofóbicos.
3. El residuo *N*-terminal del peptidomimético (inhibidor) debe estar bloqueado (***cap***) para asimilarlo mejor a la estructura del enlace peptídico del sustrato natural; la naturaleza concreta del grupo bloqueante debe ser escogida de forma que aumente la fuerza de las interacciones con el sitio activo (Cannalire *et al.* 2020).
4. El aumento de las interacciones con el sitio activo debe permitir acortar la longitud del peptidomimético para favorecer su perfil farmacocinético (despeptidación).
5. Un diseño eficaz del inhibidor con las características citadas debe permitir un encaje eficaz en el sitio activo que permita que un grupo reactivo colocado en **P1'** establezca interacciones covalentes con el grupo tiol de Cys145. En este sentido hay que resaltar que P1' es el residuo en el que se puede incluir una mayor variabilidad y está próximo a los sitios que establecen interacciones determinantes y a la fundamental Cys145 y es el que porta el grupo carbonilo reactivo. Es, en principio, el residuo ideal para colocar las funciones electrofílicas habituales en los inhibidores covalentes de proteasas.

Se configuran así, dos puntos importantes de variación, P1' que incluye el grupo reactivo (*warhead*), el grupo bloqueante (*cap*) junto a consideraciones adicionales sobre la naturaleza concreta de **P2** y el tamaño del peptidomimético. En la figura 12 se recogen estas consideraciones estructurales.

Los compuestos que a continuación describiremos sucintamente presentan diferentes grupos reactivos (*warhead*) pero todos comparten, tal como se ha explicado, el anillo de lactama en P1, como mimético que desplaza al residuo natural de glutamina, Gln; realmente este

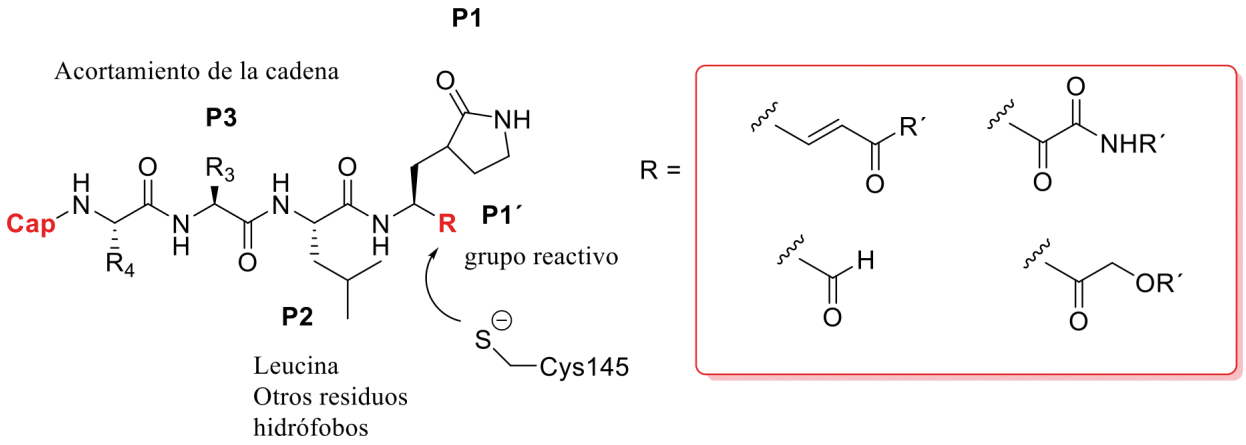


Figura 12. Requisitos estructurales de los posibles inhibidores de M^{pro}

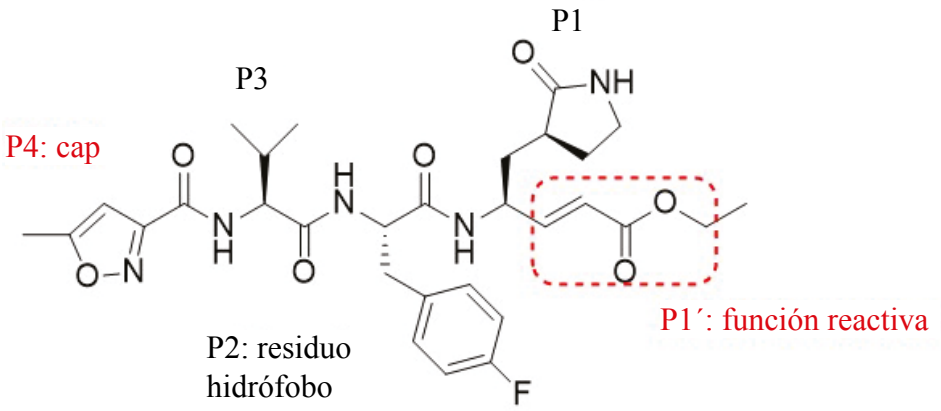


Figura 13. Estructura del Rupintrivir

residuo ha resultado encajar muy bien en el subsitio S1 del sitio catalítico de la proteasa 3CL^{pro} del SARS-CoV-2, estableciendo puentes de H claves con Phe140, His163 y Glu166 (Cannalire *et al.* 2020).

3.1. Inhibidores covalentes irreversibles. Grupo electrofílico: carbonilo α,β-insaturado

En general, los aceptores de Michael con un único grupo electroatrayente funcionan como inhibidores enzimáticos irreversibles (Lopes *et al.* 2016). Un papel importante en esta historia la ha jugado el **Rupintrivir** (AG7088), cuya estructura se presenta en la figura 13 (Patick *et al.* 1999) sustancia ensayada clínicamente en infecciones por rinovirus humanos (género de la familia *Picornaviridae*, como los enterovirus), como el resfriado común y desarrollada por Agouron Pharmaceuticals, Inc., empresa subsidiaria de Pfizer Inc. Siguiendo el esquema anterior presenta un grupo bloqueante con estructura de isooxazol y un grupo carbonilo α,β-insaturado como función electrofílica ocupando la posición P1'. La elección de esta sustancia como punto de partida de la búsqueda de inhibidores de la M^{pro} de los coronavirus se debe al hallazgo, en el marco de las investigaciones emprendidas como consecuencia de la irrupción del SARS-CoV, de que el análisis de la estructura de AG7088 cocristalizada con la proteasa 3C^{pro} del rinovirus revela interacciones semejantes en su orientación a las observadas con los primeros inhibidores estudiados de la proteasa principal del TGEV (virus de gastroenteritis transmisible, acrónimo inglés), un tipo de coronavirus que afecta a los cerdos (Anand *et al.* 2003; Mengistl *et al.* 2021)

Estos resultados, para los autores de estas primeras investigaciones, indican que «AG7088 puede ser un buen punto de partida para el diseño de fármacos anticoronavirus» (Anand *et al.* 2003; Mengistl *et al.* 2021).

Así, en una investigación de largo recorrido llevada a cabo en ámbitos académicos de nacionalidad china se profundiza en la búsqueda de inhibidores de la 3CL^{pro} de diferentes coronavirus, entre ellos, SARS-CoV y MERS-CoV, tomando a AG7088 como modelo de inhibidor de la misma, dado que los residuos P1 (lactama) y P4 (isooxazol) muestran un buen acomodo; sin embargo, el residuo P2 de *p*-flúorbencilo se muestra demasiado grande para ocupar el sitio S2 de esta proteasa, en concordancia con lo encontrado posteriormente también para el SARS-CoV-2. De esta línea de pensamiento surge, después de un intenso cribado la primera sustancia (Yang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2016; Ren *et al.* 2013), denominada por sus descubridores N3 (Yang *et al.* 2005), de la que se ha publicado su estructura de Rayos X cocristalizada con la proteína 3CL^{pro} del SARS-CoV-2 (Jin *et al.* 2020) y cuya estructura se presenta en la figura 14. Este compuesto muestra una K_i = 9 μM y una IC_{50} = 0,3 μM en el ensayo de inhibición enzimática de la proteasa del SARS-CoV y MERS-CoV. Aunque no se dan datos del mismo ensayo sobre 3CL^{pro} del SARS-CoV-2, el alto grado de identidad estructural entre las proteasas de estos coronavirus hace pensar que también inhibe a la proteasa del SARS-CoV-2, sobre todo conociendo que muestra inhibición de la replicación del mismo en ensayos celulares con EC_{50} = 16,77 μM; su grupo carbonílico

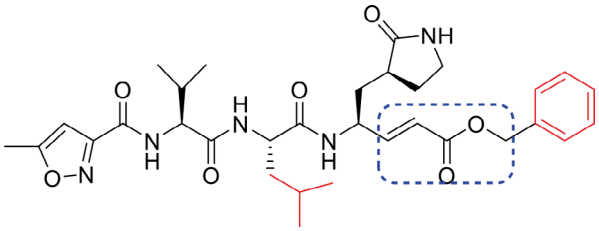


Figura 14. Estructura de N3

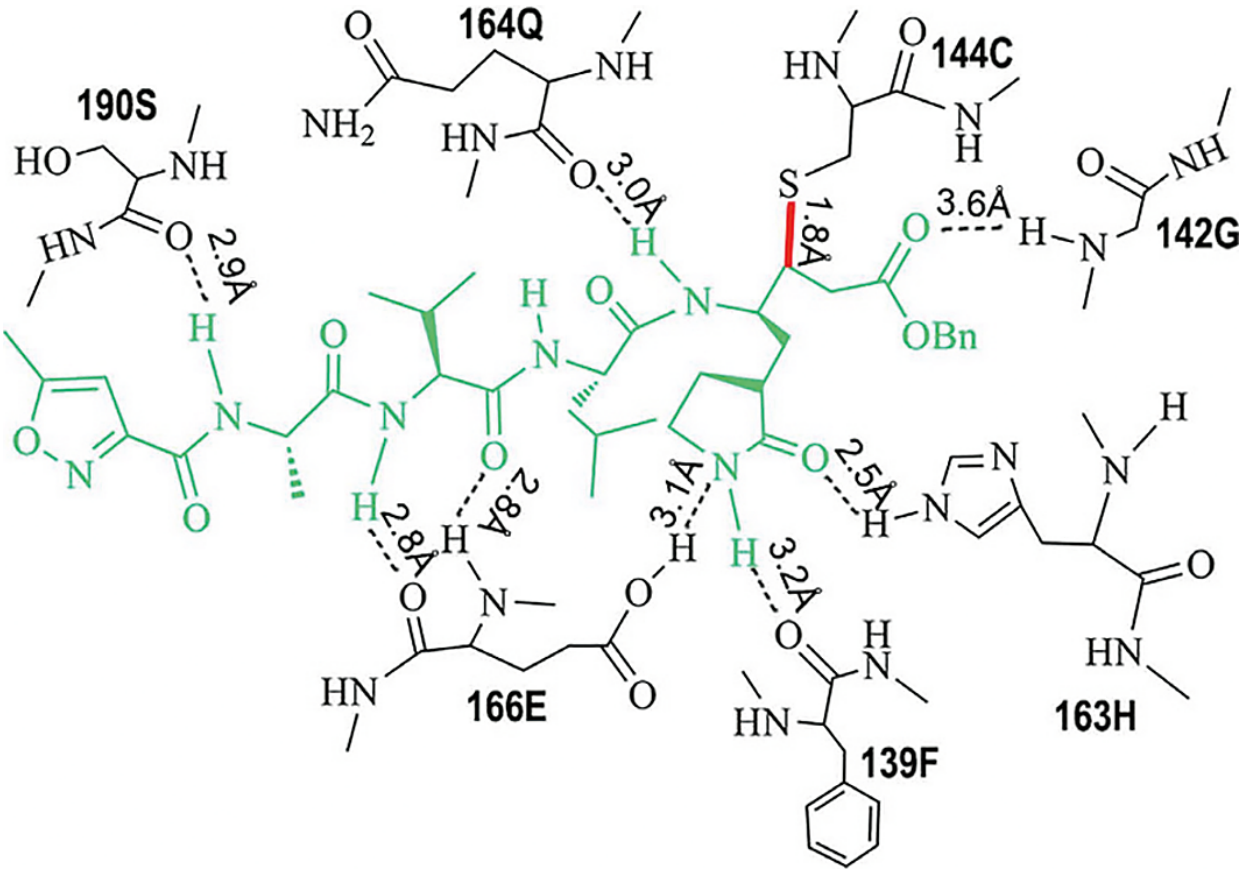


Figura 15. Interacciones de N3 en el sitio activo de M^{pro}

α,β-insaturado, funcionando como un aceptor de Michael captura, efectiva e irreversiblemente, la Cys145 (Cannalire *et al.* 2020; Yang *et al.* 2005; Wang *et al.* 2016; Yan *et al.* 2013).

La figura 15 (Wang *et al.* 2016) muestra las principales interacciones que N3 establece con el sitio activo de la proteasa principal M^{pro} del HCoV-NL63.

3.2. Inhibidores reversibles. Grupo electrofílico: α-cetoamida

Otra aproximación diferente es la escogida por el grupo nucleado en torno a Rolf Hilgenfeld, de la Universidad de Lübeck, en su búsqueda de inhibidores de estas proteasas; se trata de usar como grupo electrofílico la estructura de cetoamida (Cannalire *et al.* 2020; Ullrich y Nitsche 2020) que tan buenos resultados ha dado en el caso del HCV, y que fue introducida inicialmente en este campo de la inhibición de las proteasas como una evolución de la función aldehído usada como estructura inicial para desarrollar inhibidores covalentes reversibles por formación de un enlace hemiacetálico (Otto y Schirmeister 1997). Tal cambio se justifica por la rápida pérdida de actividad que sufren los peptidomiméticos que portan la función aldehído debido a su carácter reductor (Otto y Schirmeister 1997). En cualquier caso, el grupo carbonilo reactivo ocupa el lugar del carbonilo del enlace peptídico cuya escisión cataliza la proteasa, propiciando que la estructura hemiacetálica mimetice el intermedio del primer paso de la reacción enzimática y, por tanto, pueda ser considerada como un análogo del estado de transición que conduce a dicho intermedio, tal como se presenta en la figura 16.

El grupo investigador dice textualmente: (Ullrich y Nitsche 2020; Zhang, Lin, Kusov *et al.* 2020) «nosotros diseñamos y sintetizamos peptidomiméticos con estructura de a-cetoamidas como inhibidores de amplio espectro de las proteasas M^{pro} de betacoronavirus, alfacoronavirus y enterovirus»; el mejor de estos compuestos, el *hit* de esta investigación y cuya estructura se muestra en la figura 17, para su optimización.

En su camino de optimización de este inhibidor de proteasas M^{pro} de amplio espectro el grupo se plantea mejorar su vida media sérica, para lo que *ocultan* el enlace amida P2-P3 dentro de un anillo de piridona, para hacerlo menos abordable por las proteasas celulares; tal cambio es compatible con las estructuras conocidas (Zhang *et al.* 2020) de los sitios activos de las M^{pro} dianas (coronavirus

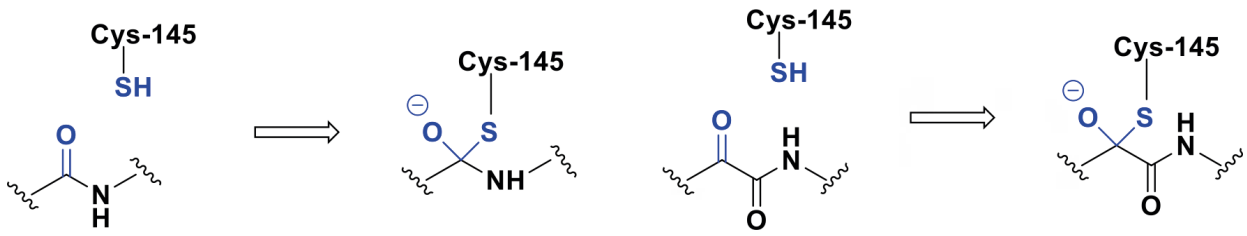


Figura 16. Inhibición de la proteasa por analogía con el estado de transición

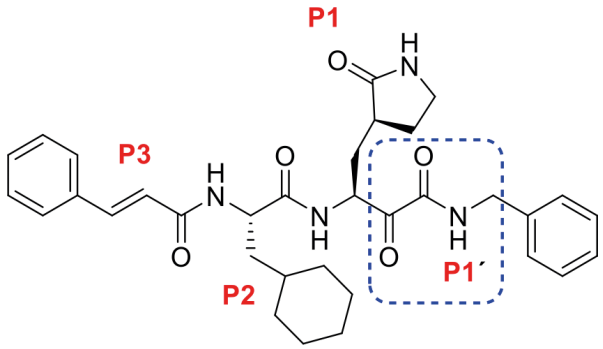


Figura 17. Cetoamida seleccionada para la optimización (Zhang *et al.* 2020)

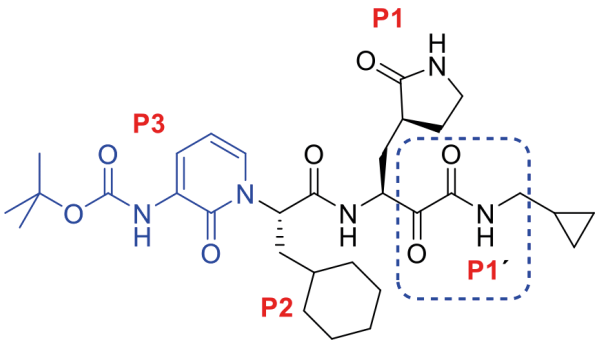


Figura 18. Desarrollo del *hit*

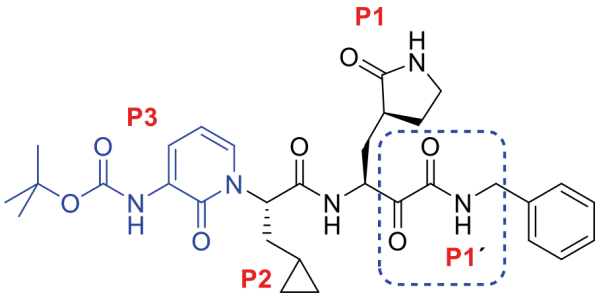


Figura 19. Cetoamida seleccionada para el desarrollo clínico

y enterovirus). Además, para aumentar la solubilidad en el plasma, reducir su enlace a proteínas plasmáticas y aumentar su estabilidad metabólica, se plantea la sustitución del residuo de cinamoílo por otras menos hidrófobos y más estables; la estructura ahora seleccionada (fig. 18) muestra una clara mejoría en los parámetros farmacocinéticos (Zhang *et al.* 2020).

Sin embargo, los cambios introducidos conducen a una pérdida de actividad frente a $3CL^{pro}$, la proteasa principal del SARS-CoV-2. La idea hasta ahora es la búsqueda de inhibidores de proteasas de amplio espectro, con el residuo de ciclohexilo para ocupar el sitio S2 de los enterovirus. Con el fin de dirigir la mirada hacia los betacoronavirus del clado b (SARS-CoV-2 y SARS-CoV), el equipo sacrifica el objetivo del amplio espectro y colocan en P2 residuos más pequeños para satisfacer la demanda del sitio S2, más pequeño, asimismo, de estos últimos. Se llega así a la estructura final seleccionada (fig. 19), primer inhibidor diseñado expresamente para la proteasa $3CL^{pro}$ del SARS-CoV-2 (Zhang *et al.* 2020).

La estructura de rayos X de este compuesto cocristalizado con la proteasa $3Cl^{pro}$ de SARS-CoV-2 (fig. 20) confirma la formación del hemiacetal debido al ataque nucleofílico de Cys145 sobre el carbonilo α del grupo reactivo cetoamida (Zhang *et al.* 2020):

Además, se confirma que el oxoanión propio de la estructura hemiacetálica se estabiliza por formación de un puente de H con la His41, mientras que el átomo de oxígeno de la amida acepta un puente de H de Gly143 y Cys145, que junto a Ser144 forman los llamados agujeros

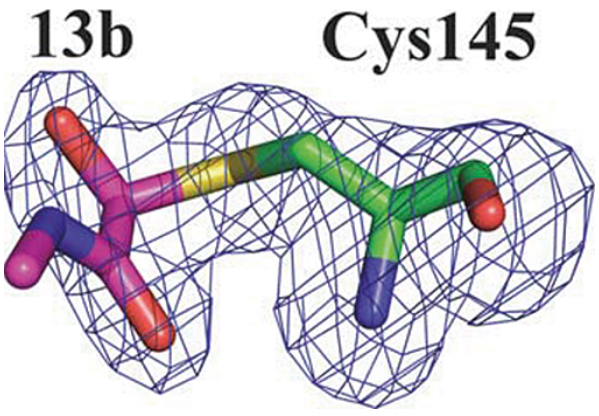
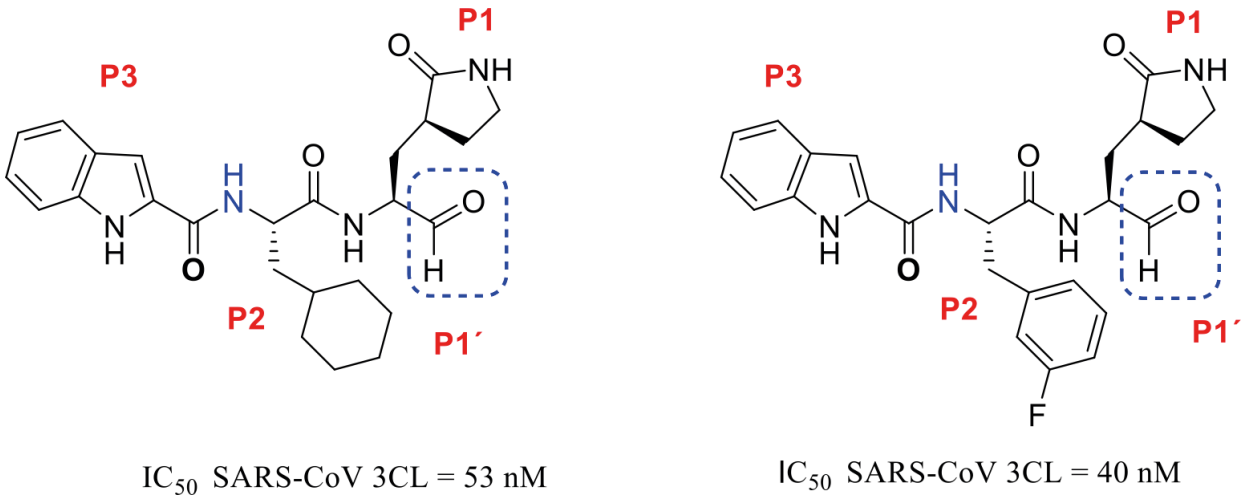


Figura 20. Estructura del oxoanión

del oxianión, «*oxyanion hole*» característicos de las cisteinil proteasas.

Este compuesto inhibe la proteasa $3Cl^{pro}$ de SARS-CoV-2 mostrando una IC_{50} = 0,67 μM, exhibiendo una potencia similar contra la proteasa de SARS-CoV y MERS-CoV, y presentando una buena actividad y tropismo



IC_{50} SARS-CoV 3CL = 53 nM

IC_{50} SARS-CoV 3CL = 40 nM

Figura 21. Inhibidores con grupo reactivo aldehído

frente a células humanas de pulmón. Interesantemente, la eliminación del grupo carbamato y la consiguiente liberación del grupo amino de P3 disminuye claramente la capacidad inhibitoria, de acuerdo con la experiencia encontrada previamente sobre la necesidad del bloqueo del extremo *N*-terminal del peptidomimético para el mantenimiento de su capacidad inhibitoria.

3.3. Grupo electrofílico: aldehído

La potencia inhibitoria aumenta drásticamente cuando el grupo electrofílico (*warhead*) es un aldehído. Así, siguiendo la misma estrategia de diseño basado en la estructura (SBDD), repetidamente comentada, y en otra interesante línea investigadora académica derivada del *clúster* de nacionalidad china y dirigida a la búsqueda de inhibidores de M^{pro} de SARS-CoV-2, se han identificado algunos de los compuestos más potentes encontrados hasta ahora. El equipo describe escuetamente la elección del grupo electrofílico así: «en nuestro diseño de nuevos inhibidores, se seleccionó un aldehído como nuevo grupo reactivo (*warhead*) en P1 con el fin de formar un enlace covalente con la cisteína» (Dai *et al.* 2020). Mantienen el anillo de lactama para la ocupación del sitio S1 de $3Cl^{pro}$, rasgo que se convierte en característico de los inhibidores de esta proteasa. Finalmente, en otra decisión importante, se refieren a P3: «un grupo indol se introduce en P3 para formar nuevos enlaces con S4 y mejorar las propiedades farmacocinéticas». Este grupo indol en P3 ya tenía una historia previa en el desarrollo de inhibidores de las proteasas de los coronavirus llevado a cabo por Pfizer, como veremos a continuación. Los compuestos seleccionados se muestran en la figura 21.

Su menor tamaño y la calidad de las interacciones promovidas por el nuevo grupo bloqueante, el indol, los acomoda mejor al sitio activo lo que permite que el residuo P2 pueda ser más grande y facilitando la formación del enlace hemiacetálico entre Cys145 y el reactivo grupo aldehído, tal como se pone en evidencia por los estudios de rayos X (Zhang *et al.* 2020) La estructura cristalina muestra también al grupo ciclohexilo inserto en el sitio S2 y al indol formando un puente de hidrógeno con Glu166 y estableciendo interacciones hidrófobas con Pro168 y Gln189 (Dai *et al.* 2020).

Ambos compuestos inhiben potentemente la infección por SARS-CoV-2 en cultivos celulares (EC_{50} = 0,53 µM, ciclohexilo, y 0,72 µM, *m*-flúorfenilo) y, a pesar de la alta reactividad de la función aldehído, presentan un buen perfil farmacocinético y el compuesto que porta el radical ciclohexilo en P2 presenta baja toxicidad lo que le convierte en un buen candidato para su posterior investigación clínica (Dai *et al.* 2020)

Por otra parte, la compañía Anivive Lifesciences, cuyos objetivos se centran fundamentalmente en el mundo veterinario, tiene los derechos de desarrollo de GC-376 (fig. 22), patentado inicialmente por la Universidad del Estado de Kansas. Se trata de un aducto bisulfítico, que funciona como profármaco de un aldehído, GC-373, que inhibe, como los anteriores, reversiblemente la $3Cl^{pro}$.

Desarrollado inicialmente como inhibidor de la 3Cl de la familia de los Picornavirus (enterovirus y rinovirus), concretamente frente a coronavirus que afectan a los felinos (FCoVs) (Kim *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015; Vuong *et al.* 2020). GC-376 ha mostrado actividad antiviral *in vitro* contra SARS-CoV-2 y ha sido seleccionado a finales de 2020, para su desarrollo por Cocrystal Pharma como tratamiento para la COVID-19. Inhibe la $3Cl^{pro}$ formando un enlace covalente con la cisteína mediante la función activa, el aldehído (Vuong *et al.* 2020).

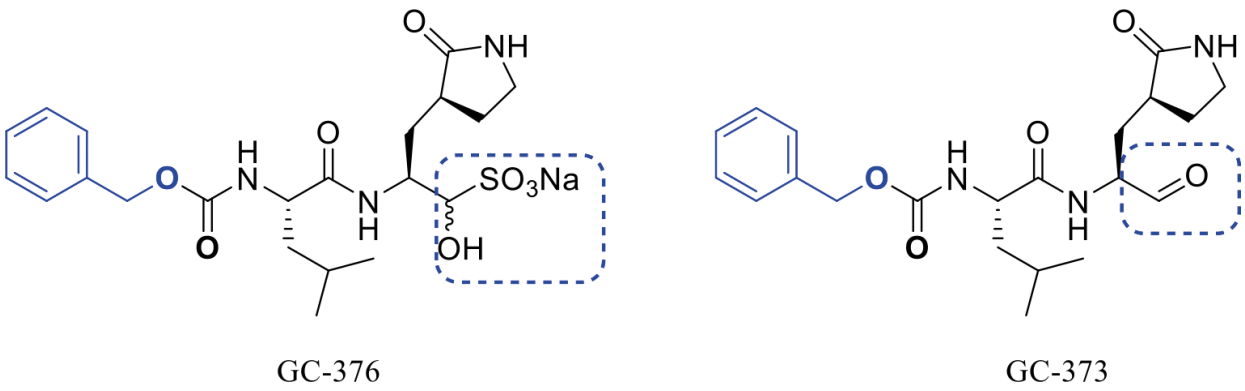


Figura 22. Desarrollo de profármacos

3.4. Modulando el carácter reversible/ irreversible de la inhibición. Grupo electrofílico: α-aciloxi/α-hidroxicetonas

Es ésta una línea cuyo desarrollo puede considerarse desde un doble punto de vista evolutivo: desde el punto de vista estructural puede considerarse, derivada de la línea inmediatamente expuesta antes, pero desde el punto de vista conceptual supone jugar con una modulación del concepto de reversibilidad/irreversilidad de la inhibición enzimática. En una investigación de **Pfizer Inc**, que se inicia a principios de siglo con la irrupción del SARS-CoV, que denominan SARS-CoV-1 para marcar claramente la diferencia con el coronavirus posterior, responsable de la COVID-19, SARS-CoV-2, se decantan, inicialmente, por utilizar como grupo electrofílico las aciloximetilcetonas (Hoffmann *et al.* 2020) desarrolladas por A. Krantz como inhibidores de cisteinil proteasas. Este grupo electrofílico reacciona inicialmente con la cisteína de la manera habitual, mediante una adición 1,2 del tiol al grupo carbonilo, dando el esperado hemiacetal que funciona reversiblemente; sin embargo, el grupo aciloximetilo, encajado en el subsitio S1' de la proteasa puede facilitar su desplazamiento SN2 a través de la emigración del azufre, produciendo finalmente una inhibición irreversible, o, bimodal, según los casos. Este tipo de inhibidores son denominados, siguiendo a Krantz (Smith *et al.* 1998) «*quiescent affinity labels*», compuestos en principio inactivos, o poco activos, con el grupo reactivo *dormido*, pero que unido reversiblemente a través de un electrófilo más reactivo que conduce a un aducto menos estable, y, alcanzando así una orientación adecuada y una alta concentración en el sitio activo (en nuestro caso subsitio S1'), pueden cambiar a una interacción irreversible (interacción irreversible latente) a través del grupo electrófilo de reactividad menor (fig. 23).

El grupo de Pfizer, empieza a desarrollar su propia línea de inhibidores de la $3CL^{pro}$ del SARS-CoV y fijan su atención también en el Rupintrivir, desarrollado para la proteasa del rinovirus, y que por las razones anteriormente expuestas (Patick *et al.* 1999), parece prometedor

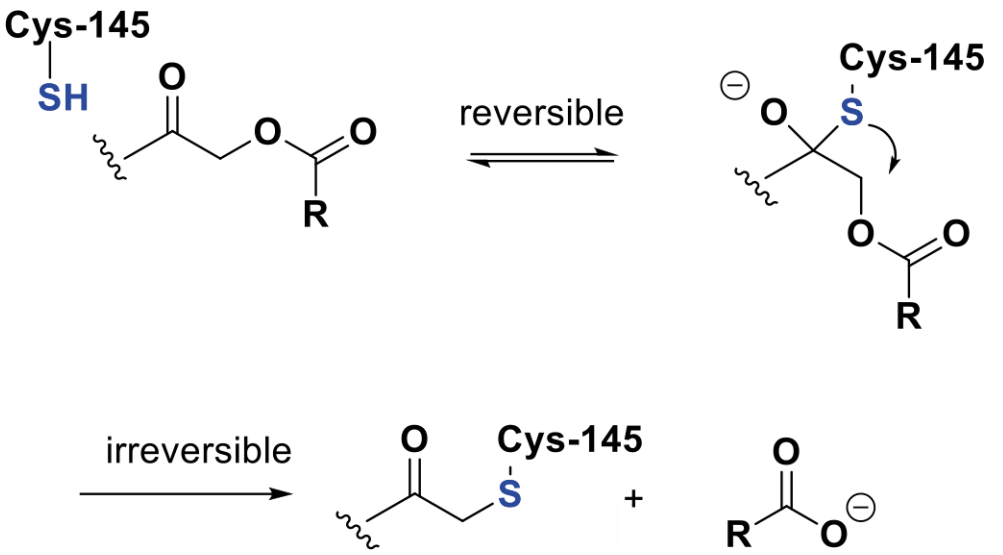


Figura 23. Interacción irreversible latente

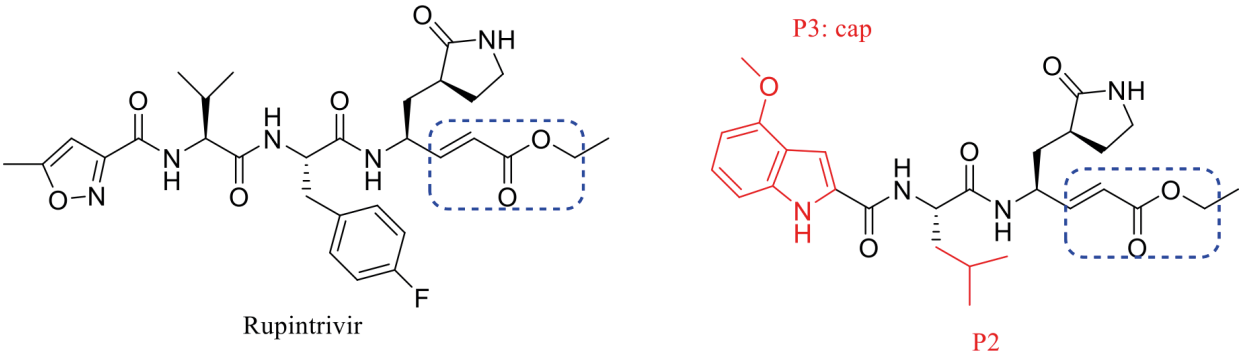


Figura 24. El indol como *cap*

también para los coronavirus. Sin embargo, tanto el rupintrivir como otros análogos de estructura estrechamente relacionada exhiben escasa o nula actividad frente a la proteasa 3CL^{pro} del SARS-CoV. El grupo de Pfizer inicia un programa de desarrollo más radical, dentro de las aproximaciones clásicas en el diseño de inhibidores de estas proteasas, dirigido a que partiendo del rupintrivir y manteniendo su grupo reactivo, se orientara más específicamente a explotar las características estructurales del sitio activo de la proteasa del SARS-CoV. Manteniendo el grupo reactivo conjugado intentan mejorar sobre todo P2, introduciendo grupos hidrófobos más pequeños y el grupo bloqueante, *cap*, con objeto de reforzar las interacciones lo que permitiría, además, abordar un proceso de despeptidación que mejorara las propiedades farmacocinéticas; es en este contexto cuando aparece por primera vez un grupo de naturaleza indólica como *cap* eficaz en el diseño de inhibidores de la proteasa de los coronavirus. La evolución seguida se esquematiza en la figura 24.

La estructura de los complejos de este compuesto y análogos con la proteasa 3Cl^{pro} del SARS-CoV-1 pone de manifiesto el buen ajuste del anillo de lactama con S1, del residuo P2 y el establecimiento de un puente de *H* entre el *NH* del indol, nuevo grupo bloqueante (*cap*) del residuo P2, con el esqueleto de la proteína, además de establecer nuevas interacciones hidrófobas en el bolsillo de P3. Sin embargo, las interacciones de P1', que incluye el grupo electrofílico en esta proteasa del SARS-CoV-1 no son, en su conjunto, favorables, a diferencia de lo que sucede con la proteasa HRV 3C (rinovirus) (Hoffmann *et al.* 2020). Por ello, el grupo de Pfizer decide, finalmente cambiar la naturaleza de su grupo reactivo en P1' y, en una decisión clave que marca el perfil de toda la línea y que justifican escuetamente, «para mejor mimetizar el intermedio tetraédrico generado en la ruptura del enlace amida» (Hoffmann *et al.* 2020) se propone el diseño de inhibidores covalentes reversibles e irreversibles de la proteasa 3Cl del SARS-CoV-1 basados en el grupo funcional ceto, funcionalizado para poder evolucionar desde una inhibición reversible a otra irreversible. Esta investigación pionera de Pfizer sobre la proteasa del SARS-CoV-1 se recoge, inicialmente, en dos patentes de la época (Kania *et al.* 2006). Después de un gran trabajo en el que se preparan y valoran numerosos compuestos, se selecciona el siguiente como inhibidor irreversible la estructura que se presenta en la figura 25.

La facilidad para la inhibición irreversible está relacionada con la capacidad de pasar de una estructura hemiacetálica inicial al desplazamiento del grupo aciloxi; por eso se observa una relación lineal entre la irreversibilidad y el grado de buen grupo saliente que este presenta, que a su vez se correlaciona con el pKa del anión carboxilato que sale.

Este compuesto es el más activo de la serie al tiempo que exhibe poca reactividad hacia nucleófilos endógenos, como glutatión, consecuencia del mecanismo en que está basado su diseño: para la interacción irreversible necesita ajustarse a la diana, y ser *cazado* previamente de una forma reversible; se muestra estable en el plasma humano ($t_{1/2}$ > 60 min) (Hoffmann *et al.* 2020). Sin embargo, es muy poco soluble en los medios de formulación clínicamente relevantes, lo que limitó su desarrollo posterior. La optimización para mejorar la solubilidad manteniendo la potencia inhibitoria se consiguió sustituyendo el bloqueante, *cap*, por otros más pequeños y más polares. El compuesto de la serie finalmente

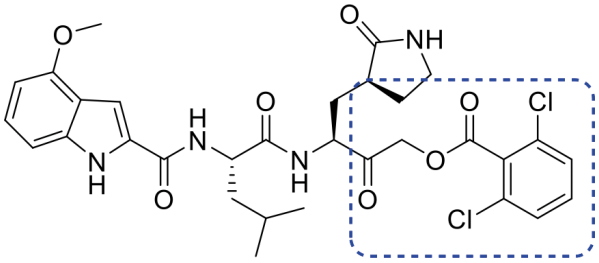


Figura 25. Prototipo de inhibidor de M^{pro} del SARS CoV de Pfizer

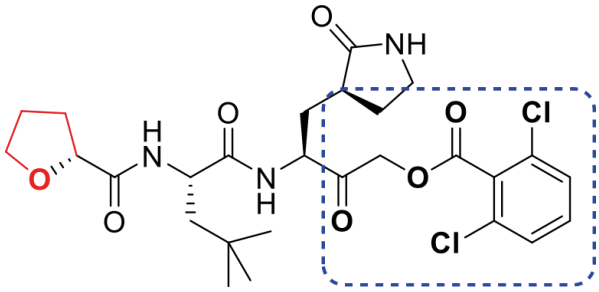


Figura 26. Inhibidor irreversible seleccionado de la M^{pro} de SARS-CoV

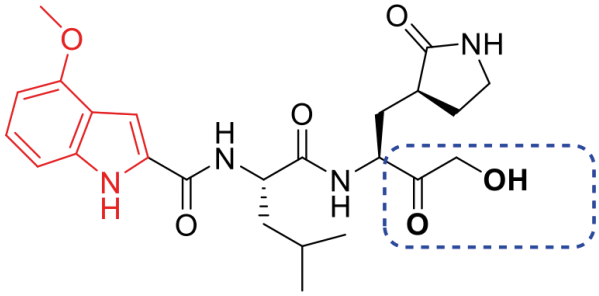


Figura 27. Estructura de PF-00835231

seleccionado como inhibidor irreversible de la M^{pro} de SARS-CoV (fig. 26) tenía un perfil de potencia y solubilidad que permiten su desarrollo clínico posterior.

Aunque focalizado en la búsqueda de inhibidores irreversibles con afinidad *dormida*, la estructura de α-aciloxi-cetonas facilita la preparación y evaluación de sus análogos sin esterificar, α-hidroxi-cetonas, entre las que destacan los derivados de metil-cetonas, hidroximetilcetonas (*HMK*). Efectivamente, al comienzo de esta investigación ya es conocido que peptidomiméticos con residuos de hidroximetilcetonas y éteres derivados son potentes inhibidores *reversibles* de cisteinil proteasas, como catepsinas y cruzaína (Hoffmann *et al.* 2020). Al no poseer un buen grupo saliente en una posición activada, la cisteína solo encuentra disponible el carbonilo de la cetona. De un amplio cribado el equipo de Pfizer selecciona el compuesto denominado PF-00835231 (fig. 27) que posee, dentro de una estructura molecular pequeña los mejores rasgos para cada residuo del sustrato. Así, presenta el anillo canónico de lactama en P1, el residuo de leucina en P2 y el *cap* de estructura indólica que ahora no presenta problemas en cuanto a la solubilidad en los vehículos galénicos usados debido a la diferente polaridad del residuo en P1'. Este residuo posibilita la formación de la estructura hemiacetálica intermedia que mimetiza al intermedio (y, por tanto, al estado de transición) de la reacción enzimática, al tiempo que el hidroxilo, además de influir en las propiedades fisicoquímicas, puede establecer interacciones adicionales en el sitio activo (Hoffmann *et al.* 2020).

De todos los compuestos implicados en esta investigación, PF-00835231 se selecciona finalmente como candidato para su desarrollo clínico para el SARS-CoV-1 pero «con la respuesta exitosa de la sanidad pública que consigue terminar la pandemia en 2003, el programa sobre el compuesto se suspendió» (Hoffmann *et al.* 2020).La irrupción del SARS-CoV-2 hizo centrar la atención sobre este compuesto con buenos resultados preclínicos mostrando además un ajuste al sitio activo de M^{pro} de SARS-CoV-2, en todo análogo al caso del SARS-CoV-1. El equipo de Pfizer concluye que

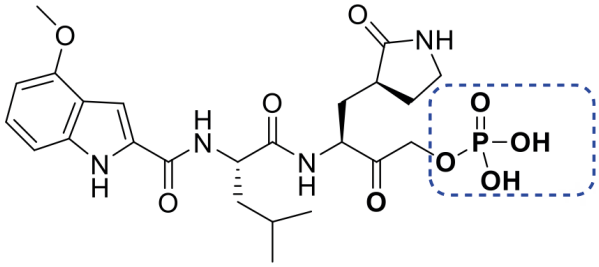


Figura 28. Estructura de PF-07304814

«PF-00835231 posee una solubilidad aceptable, es estable en el plasma e inhibe potentemente la proteasa 3Cl^{pro} del SARS-CoV-2 lo que justifica su desarrollo como un agente potencial para el tratamiento de pacientes con COVID-19». Interesantemente, ensayos basados en cultivos celulares ponen de manifiesto que PF-00835231 presenta efectos aditivos/sinérgicos con Remdesivir contra SARS-CoV-2.

Para aumentar la solubilidad en agua con el fin de facilitar su administración intravenosa, que es la preferible en casos graves y/o avanzados de la enfermedad, y dentro de un programa de diseño de profármacos de PF-00835231, se ha seleccionado una molécula con estructura de fosfato, PF-07304814 (fig. 28), como un posible candidato clínico que permitiría dosis verdaderamente efectivas (500 mg/día) En septiembre de 2020 Pfizer anunció el inicio de un ensayo clínico (NCT04535167) para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de PF-07304814. La segunda fase del ensayo se anunció por Pfizer a final de junio de 2021.

3.5. Primer inhibidor de la proteasa principal del SARS-CoV-2 de administración oral

Pfizer continúa con su desarrollo de inhibidores de la proteasa M^{pro} de SARS-CoV-2, buscando posibilitar su administración por vía oral, dado que esta forma de administración es la aconsejable como profilaxis o en las etapas iniciales de la infección. En este sentido, en abril de 2021, Pfizer ha comunicado el inicio de un ensayo

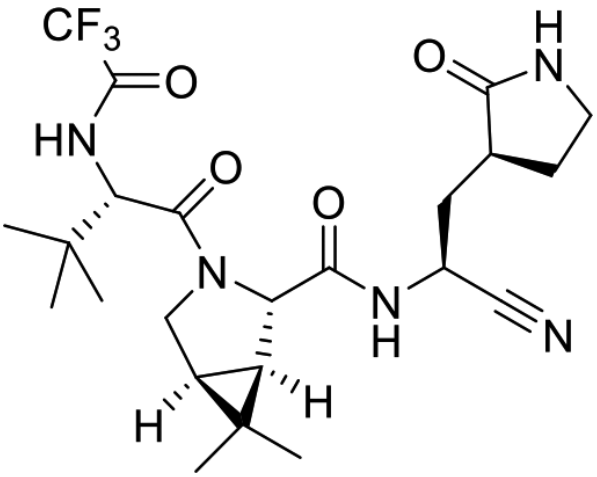


Figura 29. Estructura de PF-0732132

clínico de Fase I (NCT04756531) para su nuevo prototipo seleccionado, PF-0731332, cuya estructura se presenta en la figura 29 (Halford 2021).

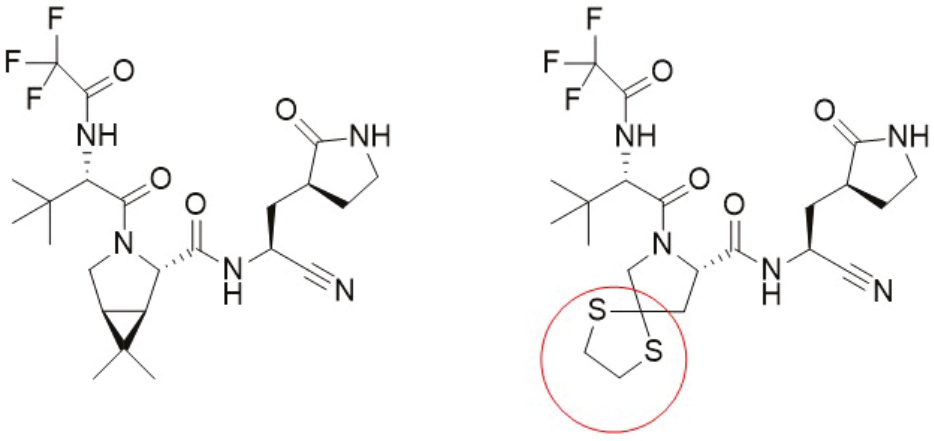
PF-07321332 posee un grupo nitrilo como grupo reactivo (*warhead*) con el objeto de eliminar el grupo donador de puentes de H (HBD), y mejorar la absorción oral: Con el mismo fin de eliminar HBD, introduce un residuo bicíclico para mimetizar la leucina. Este nuevo residuo encaja bien en S2 pero la distorsión introducida saca a P3 de S3; por lo tanto, trabajan grupos en P3, más flexibles y con capacidad de establecer interacciones; con este fin se selecciona el grupo trifluoroacetilo (Vandyck 2021; Owen *et al.* 2021). En abril de 2021, Pfizer comunica el inicio de un ensayo clínico de Fase I (NCT04756531) para contrastar la seguridad, tolerabilidad y perfil farmacocinético del compuesto. Pfizer propone PAXLOVID™, una asociación con una dosis baja de ritonavir, un inhibidor de la proteasa del HIV, dado que retarda la metabolización de PF-07321332, por ser un también un inhibidor del citocromo P450. Su uso fue aprobado por la EMA y la FDA en diciembre de 2021.

En enero de 2023 se ha aprobado por parte de la agencia reguladora china (NMPA) el uso de un nuevo agente para la COVID-19; se trata del denominado simnotrelvir, cuya estructura, que se presenta en la figura 30, está inspirada en la del nirmaltrevir, en un caso claro de aproximación *me too*. Ha sido desarrollado por Simcere Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai Institute of Materia y Wuhan Institute of Virology y el medicamento aprobado, de uso oral, es también una asociación con ritonavir (Simcere 2023; Zhu, K-W. 2023).

3.6. Búsqueda de inhibidores de la proteasa mpro de SARS-CoV-2 a través de la estrategia de reutilización (*repurposing*) o reposicionamiento (*repositioning*)

Independientemente del diseño y desarrollo de nuevas moléculas dirigidas a la inhibición de la proteasa principal del SARS-CoV-2 que se ha esbozado aquí, se ha continuado con la estrategia de reposicionamiento, considerada ésta de una forma cada vez más sistemática. Es el caso de una exhaustiva y elegante investigación llevada a cabo por un gran y complejo grupo, nucleado por científicos de la universidad de Chicago y en la que finalmente se selecciona una sustancia ya conocida para otros usos farmacológicos, el Masitinib, para su estudio en ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento de la COVID-19 (Drayman *et al.* 2021).

En una primera etapa se probaron 1900 fármacos aprobados para uso humano o estudiados ya en ensayos clínicos Fase II o Fase III y, por consiguiente, seguros en humanos. En este primer test se comprueba la capacidad de todos estos compuestos para inhibir la infección en células humanas A549 del coronavirus HCoV-OC43



Nirmaltrevir Simnotrelvir

Figura 30. Estructura de Simnotrelvir

(denominado también simplemente OC43). La elección de este virus la justifica el equipo por ser un «patógeno humano que pertenece al mismo clado de beta coronavirus que SARS-CoV-2 que puede ser estudiado bajo condiciones de bioseguridad, y, también, por un intento de descubrir fármacos anti-coronavirus de amplio espectro que serían beneficiosos para tratar el SARS-CoV-2 y futuros coronavirus emergentes».

En la segunda etapa, después de un complejo y exhaustivo análisis, se seleccionan 26 compuestos que se prueban, en altas condiciones de bioseguridad, en su capacidad para inhibir la infección por SARS-CoV-2 de células humanas A549 que sobreexpresan el receptor ACE2 (receptor 2 de la enzima convertidora de angiotensina, al que se une, como se ha citado, la proteína S del SARS-CoV-2). El resultado de este segundo escalón en la investigación es la identificación de 20 fármacos, ya usados con seguridad en humanos, capaces de inhibir la infección de células humanas por ambos coronavirus, OC43 y SARS-CoV-2, aunque como era de esperar, los compuestos presentan, según los casos, una capacidad inhibitoria diferente frente a cada uno de ellos. A continuación, se examina la capacidad de estas 20 sustancias para inhibir la proteasa principal del SARS-CoV-2, $3CL^{pro}$. El más potente de todos ellos es **Masitinib** (fig. 31), que inhibe completamente la actividad de esta proteasa en células. Masitinib es un inhibidor tirosinquinasas entre las que destaca c-kit y PDGFR. Biodisponible oralmente; ha sido aprobado para el tratamiento de tumores en mastocitos en perros y está en ensayos clínicos humanos, en Fase II o III, para el tratamiento de cáncer, asma, enfermedad de Alzheimer y ELA (Drayman *et al.* 2021).

Se ha determinado la estructura del complejo de masitinib enlazado a $3CL^{pro}$ mediante rayos X. Dentro de un encaje muy ajustado destaca que el anillo de piridina se sitúa en el sitio S1 (como el anillo de lactama de los inhibidores estudiados), donde, además de interacciones hidrófobas, se establece un puente de H entre el *N* piridínico y la His163 situada en S1, y el residuo de aminotiazol que establece dos puentes de H, uno entre el grupo amino y His164 y otro entre el nitrógeno del aminotiazol y el *S* de la Cys145, el residuo catalítico clave de $3CL^{pro}$. Todo el esqueleto establece interacciones adicionales excepto el residuo de piperazina que queda fuera y desordenado (Drayman *et al.* 2021) quizás por eso, el principal metabolito del masitinib, AB3280, al que solo le falta el metilo terminal del anillo de piperazina, que no participa en el enlace con el sitio activo, presenta un perfil inhibitorio casi idéntico.

Masitinib funciona como un inhibidor competitivo de $3CL^{pro}$ que se une al sitio activo del enzima e inhibe su capacidad catalítica en células, *in vitro* e *in vivo*.

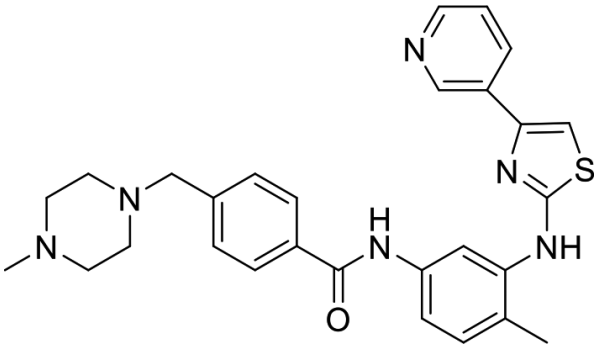


Figura 31. Estructura de Masitinib

Notablemente, no exhibe actividad inhibitoria de la otra proteasa del SARS-CoV-2, la PL^{pro}, del tipo de la papaína (P, *papaine like*). Actualmente está registrado un ensayo clínico de Fase II, NCT04622865, para evaluar la eficacia del masitinib en pacientes con COVID-19 severo o moderado, aunque los autores de la investigación sobre el masitinib consideran que este «sería más beneficioso en las etapas tempranas de la infección, cuando un antiviral presenta su máximo efecto» (Drayman *et al.* 2021).

BIBLIOGRAFÍA

AGOSTINI, M.L., ANDRES, E.L., SIMS, A.C., ..., CLARKE, M.O., BARIC, R.S. & DENISON, M.R. (2020), Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. ChemBioChem 21: 730-738.

ANAND, K., ZIEBUHR, J., WADHWANI, P., MESTERS, J.R. & HILGENFELD, R. (2003), Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. Science 300: 1763-1767.

ANDERSEN, K.G., RAMBAUT, A., LIPKIN, W.I., HOLMES, E.C. & GARRY, R.F. (2020), The Proximal Origin of SARS-CoV-2. Nature Medicine 26: 450-452.

ASBMB (2020), https://www.asbmb.org/asbmb-today/science/050720/a-mechanism-for-remdesivir-activity-and-a-platform. Consultado el 11 de octubre de 2020.

BALTIMORE, D. (1971), Expression of Animal Virus Genomes. Bacteriological Reviews 35(3): 235-24. Recoge la clasificación propuesta por el autor, David Baltimore, galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1975, basada en el tipo de ácido nucleico de los virus (ADN o ARN) y su modo de expresión génica.

BANERJEE, R., PERERA, L. & TILLEKERATNE, L.M.V. (2021), Potential SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors. Drug Discovery Today, 26(3): 804-816.

BEIGEL, J.H., TOMASHEK, K.M., DODD, L.E., ..., OSINUSI, A., NAYAK, S. & LANE, H.C. (2020), Remdesivir for the Treatment of COVID-19-Final Report. New England Journal of Medicine 383(19): 1813-1826.

BESTLE, D., HEINDL, M.R., LIMBURG, H., ..., GARTEN, W., STEINMETZER, T. & BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER. E. (2020), TMPRSS2 and Furin Are Both Essential for Proteolytic Activation of SARS-CoV-2 in Human Airway Cells. Life Science Alliance, 3: e202000786.

BOLCATO, G., BISSARO, M., PAVAN, M., STURLESE, M. & MORO, S. (2020), Targeting the Coronavirus SARS-CoV-2: Computational Insights into the Mechanism of Action of the Protease Inhibitors Lopinavir, Ritonavir and Nelfinavir. Scientific Reports10: 20927.

CANNALIRE, R., CERCHIA, C., BECCARI, A.R., DI LEVA, F.S. & SUMMA. V. (2020), Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. Journal of Medicinal Chemistry 65(4): 2716-2746.

CAO, Z., GAO, W., BAO, H., ..., NING, G., GAO, Y., ZHAO, R. (2023), VV116 versus Nirmatrelvir–Ritonavir for Oral Treatment of COVID-19. New England Journal of Medicine 388(25): 406-417.

CHAUDHARY, N., WEISSMAN, D. & WHITEHEAD, K.A. (2021), mRNA Vaccines for Infectious Diseases: Principles, Delivery and Clinical Translation. Nature Reviews Drug Discovery 20: 817-838.

DAI, W., ZHANG, B., JIANG, X.M., ..., XU, Y., YANG, H. & LIU, H. (2020), Structure-Based Design of Antiviral Drug Candidates Targeting the SARS-CoV-2 Main Protease. Science 368: 1331-1335.

DOLGIN, D. (2021), The Tangled History of mRNA Vaccines. Nature 597: 318-324.

DRAYMAN, N., DEMARCO, J.K., JONES, K.A., ..., JOACHIMIAK, A., RANDALL, G. & TAY, S. (2021), Masitinib Is a Broad Coronavirus 3CL Inhibitor that Blocks Replication of SARS-CoV-2. Science 373: 931-936.

EASTMAN, R.T., ROTH, J.S., BRIMACOMBE, A., ..., SHEN, M., PATNAIK, S. & HALL, M.D. (2020), Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. ACS Central Science 6(5): 672-683.

EMA (European Medicines Agency), https://www.ema.europa.eu/en/news/first-covid-19-treatment-recommended-eu-authorisation [consultado el 10 de junio de 2021].

GORDON, C.J., TCHESNOKOV, E.P., FENG, J.Y., PORTER, D.P. & GÖTTE, M. (2020), The Antiviral Compound Remdesivir Potently Inhibits RNA Dependent RNA Polymerase from Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. Journal of Biological Chemistry 295(15): 4773-4779.

GORDON, D.E., JANG, G.M., BOUHADDOU, M., ..., SHOKAT, K.M., SHOICHET, B.K. & KROGAN, N.J. (2020), A SARS-CoV-2 Protein Interaction Map Reveals Targets for Drug Repurposing. Nature 583: 459-468.

HALFORD, B. (2021), Pfizer Unveils Its Oral SARS-CoV-2 inhibitor. C&EN 99: 7; DOI: 10.1021/cen-09913-scicon3.

HOFFMANN, M., KLEINE-WEBER, H., SCHROEDER, S., ..., MÜLLER, M.A., C. DROSTEN, C. & PÖHLMANN, S. (2020), SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell 181(2): 271-280.

HOFFMAN, R.L., KANIA, R.S., BROTHERS, M.A., ..., SOLOWIEJ, J.E., STEPPAN, C.M. & TAGGART, B. (2020), Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. Journal of Medicinal Chemistry 63(21): 12725-12747.

JIN, Z., DU, X., XU, Y., ..., JIANG, H., RAO, Z. & YANG, H. (2020), Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and Discovery of Its Inhibitors. Nature 582: 289-293.

KANIA, R.S., MITCHELL, L.J. & JR, NIEMAN, J.A. (2006), Anticoronaviral Compounds and Compositions, Their Pharmaceutical Uses and Materials for Their Synthesis. R.S. Kania, L.J. Mitchell Jr, J.A. Nieman, WO2005113580A1, WO2006061714A2.

KIM, Y., LOVELL, S., TIEW, K.C., ..., BATTAILE, K.P., GROUTAS, W.C. & K-O. CHANG, K.O. (2012), Broad-Spectrum Antivirals against 3C or 3C-Like Proteases of Picornaviruses, Noroviruses, and Coronaviruses. Journal of Virology 86(21): 11754-11762.

KIM, Y., SHIVANNA, V., NARAYANAN, S., ..., KANKANAMALAGE, A.C.G., GROUTAS, W.C. & CHANG, K. (2015), Broad-Spectrum Inhibitors against 3C-Like Proteases of Feline Coronaviruses and Feline Caliciviruses. Journal of Virology 89(9): 4942-4950.

KIRCHDOERFER, R.N. & WARD, A.B. (2019), Structure of the SARS-CoV nsp12 Polymerase Bound to nsp7 and nsp8 Co-Factors. Nature Communications 10: 2342.

KUPFERSCHMIDT, K. (2021), WHO Relaunches Global Drug Trial with Three New Candidates. Science 373: 606-607.

LOPES, F., SANTOS, M.M.M. & MOREIRA, R. (2016), Designing Covalent Inhibitors: A Medicinal Chemistry Challenge. Biomedical Chemistry, 2016: 44-60, doi.org/10.1515/9783110468755-002

MATHESON, N.J. & LEHNER, P.J. (2020), How Does SARS-CoV-2 Cause COVID-19? Science 369: 510-511.

MATTHEWS, D.A., DRAGOVICH, P.S., WEBBER, S.E., ..., BROTHERS, M.A., DELISLE, D.M. & WORLAND, S.T. (1999), Structure-Assisted Design of Mechanism-Based Irreversible Inhibitors of Human Rhinovirus 3C Protease with Potent Antiviral Activity against Multiple Rhinovirus Serotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 96: 11000-11007.

MEHTA, P., MCAULEY, D.F., BROWN, M., SANCHEZ, E., TATTERSALLR.S. & MANSON, J.J. (2020), COVID-19: Consider Cytokine Storm Syndromes and Immunosuppression. Lancet 395: 1033-1034.

MENGIST, H.M., DILNESSA, T. & JIN, T. (2021), Structural Basis of Potential Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease. Frontiers in Chemistry 9: 622898.

NIH (2021), https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapeutic-management/. Consultado el 4 de agosto de 2021.

OTTO, H.H. & SCHIRMEISTER, T. (1997), Cysteine Proteases and Their Inhibitors. Chemical Reviews 97(1): 133-171.

OWEN, D.R., ALLERTON, CH.M.N., ANDERSON, A.S., ..., WEI, L., YANG, Q. & Y ZHU, Y. (2021), An Oral SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor Clinical Candidate for the Treatment of COVID-19. Science 374: 1586-1593.

PAPAIN, I., SCHECHTER, I. & BERGER, A. (1967), On the Size of the Active Site in Proteases. Biochemical Biophysical Research Communications 27(2): 157-162.

PATICK, A.K., BINFORD, S.L., BROTHERS, M.A., ..., ZALMAN, L.S., MATTHEWS, D.A. & WORLAND, S.T. (1999), In Vitro Antiviral Activity of AG7088, a Potent Inhibitor of Human Rhinovirus 3C Protease. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(10): 2444-2450.

REN, Z., YAN, L., ZHANG, N., ..., Y., YANG, C., LOU, Z., RAO, Z. (2013), The Newly Emerged SARS-Like Coronavirus HCoV-EMC Also Has an «Achilles' Heel»: Current Effective Inhibitor Targeting a 3C-Like Protease. Protein & Cell 4(4): 248-250.

SCUDELLARI, M. (2021), How the Coronavirus Infects Our Cells. Nature, 595: 640-644.

SIDDIQI, H.K. & MEHRA, M.R. (2020), COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. The Journal of Heart and Lung Transplantation 39(5): 405-407.

SIMCERE, https://www.simcere.com/en/news/detail.aspx?mtt=317. Consultado el 16 de marzo de 2023.

SMITH, R.A., COPP, L.J., COLES, P.J., ..., SPENCER, R.W., HEARD, S.B. & KRANTZ, A. (1998), New Inhibitors of Cysteine Proteinases. Peptidyl Acyloxymethyl Ketones and the Quiescent Nucleofuge Strategy. Journal of the American Chemical Society110(13): 4429-4431.

STOCKMAN, L.J., BELLAMY, R. & GARNER, P. (2006), SARS: Systematic Review of Treatment Effects. PLOS Medicine 3(9): e343.

ULLRICH, S. & NITSCHE, C. (2020), The SARS-CoV-2 Main Protease as Drug Target. Bioorganic Medicinal Chemical Letters 30(17): 127377.

VANDYCK, K. & DEVAL, J. (2021), Considerations for the Discovery and Development of 3-Chymotrypsin-Like Cysteine Protease Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Infection. Current Opinion in Virology 49: 36-40.

V'KOVSKI, P., KRATZEL, A., STEINER, S., STALDER, H. & THIEL, V. (2021), Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2. Nature Reviews Microbiology 19(3): 155-170.

VUONG, W., KHAN, M.B., FISCHER, C., ..., TYRRELL, D.L., VEDERAS, J.C. & LEMIEUX, M.J. (2020), Feline Coronavirus Drug Inhibits the Main Protease of SARS-CoV-2 and Blocks Virus Replication. Nature Communications 11, 4282-4289.

WANG, F., CHEN, C., TAN, W., YANG, K. & H. YANG, H. (2016), Structure of Main Protease from Human Coronavirus NL63: Insights for Wide Spectrum Anti- Coronavirus Drug Design. Scientific Reports. 6: 22677.

WU, D., KOGANTI, R., LAMBE, U.P., YADAVALLI, T., NANDI, S.S. & SHUKLA, D. (2020), Vaccines and Therapies in Development for SARS-CoV-2 Infections. Journal of Clinical Medicine 9(6): 1885-2003.

XIE, Y., YIN, W., ZHANG, Y., ..., ZHANG, L., XU, H.E., SHEN, J. (2021), Design and Development of an Oral Remdesivir Derivative VV116 against SARS-CoV-2. Cell Research 31(11): 1212-1214.

YANG, H., XIE, W., XUE, X., ..., D. MA, D., M. BARTLAM & RAO, Z. (2005), Design of Wide-Spectrum Inhibitors Targeting Coronavirus Main Proteases. PLoS Biology 3(10): e324.

YE, X., LUO, Y., XIA, S., ..., W.-J. DU, W., RUAN, Z. & HONG. L. (2020), Clinical Efficacy of Lopinavir/Ritonavir in the Treatment of Coronavirus Disease 2019. European Review for Medical and Pharmacological Science 24(6): 3390-3396.

ZHANG, L., LIN, D., KUSOV, Y., ..., SNIJDER, E.J., LIU, H. & HILGENFELD, R. (2020), α-Ketoamides as Broad-Spectrum Inhibitors of Coronavirus and Enterovirus Replication: Structure-Based Design, Synthesis, and Activity Assessment. Journal of Medicinal Chemistry 63(9): 4562-4578.

ZHANG, L., LIN, D., SUN, X., ..., BECKER, S., ROX, K. & HILGENFELD, R. (2020), Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease Provides a Basis for Design of Improved a-Ketoamide Inhibitors. Science, 368: 409-412.

ZHANG, R., ZHANG, Y., ZHENG, W., ..., XIAO, G., YUANCHAO XIE, Y. & ZHANG, L. (2022), Oral Remdesivir Derivative VV116 Is a Potent Inhibitor of Respiratory Syncytial Virus with Efficacy in Mouse Model. Signal Transduction and Targeted Therapy 7(1): 123.

ZHAO, J., GUO, S., YI, D., ..., LIN, R., LIANG, C. & LIU, Z. (2021), A Cell-Based Assay to Discover Inhibitors of SARS-CoV-2 RNA Dependent RNA Polymerase. Antiviral Research 190: 105078.

ZHU, K.-W. (2023), Deuremidevir and Simnotrelvir–Ritonavir for the Treatment of COVID-19. ACS Pharmacology & Translational Science 6(9): 1306-1309.

Capítulo XX

El COVID-19 en el medio ambiente: presencia, persistencia, transmisión, vigilancia, inactivación y desafíos

José Luis Gómez Ariza

Académico de número de la Academia de Ciencias, Artes y Letras de Huelva.
Departamento de Química. Facultad de Ciencias Experimentales. Centro de Investigación en Recursos Naturales, Salud y Medio Ambiente (RENSMA). Universidad de Huelva

INTRODUCCIÓN

La propagación mundial de la epidemia causada por el nuevo coronavirus (CoV) denominado COVID-19 o SARS-CoV-2, cuyo primer brote aparece en la ciudad de Wuhan a finales de 2019 (WHO 2020), ha representado un enorme problema sanitario y humano, que se convirtió en pandemia desde marzo de 2020 (WHO 2020). Los datos iniciales de la WHO en septiembre de 2020 estimaron una incidencia de 30 millones de afectados y más de 1 millón de muertes a nivel mundial, cifras que han quedado rápidamente desfasadas por el avance de la pandemia, hasta alcanzar en septiembre de 2022 más de 6,5 millones de muertes (Worldometer 2022).

El COVID-19 se transmite por contacto de persona a persona (personas infectadas o con el virus en estado de incubación-asintomáticos), por contacto con superficies infectadas o piel con piel, a través de la boca, nariz, ojos, o por inhalación del virus exhalado en las microgotas de la respiración, junto a los episodios de tos o estornudos de una persona infectada (Qu *et al.* 2020; Hellewell *et al.* 2020; Chan *et al.* 2020a; Meselson 2020), lo que ha hecho recomendable el *distanciamiento social* para reducir la propagación del virus. Por otro lado, la propagación y persistencia del SARS-CoV-2 en el tracto gastrointestinal y su correlativa excreción por las heces constituye una importante ruta de transmisión potencial al medio ambiente (Sun *et al.* 2020; Tang *et al.* 2020; Wöfel *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2020a), debiéndose también considerar su presencia en el aire, en las partículas atmosféricas y en los objetos domésticos, como pomos de puertas, grifos y manijas, y otros muchos (Cai *et al.* 2020; Qu *et al.* 2020; Chin *et al.* 2020). Posteriormente, se ha comprobado la presencia del virus en aguas residuales y de alcantarillado (Ahmed *et al.* 2020a; Arora *et al.* 2020; Balboa *et al.* 2020; Kokamemi *et al.* 2020a; Kokamemi *et al.* 2020b; Kumar *et al.* 2020; Medema *et al.* 2020a; Meulemans 1987; Nemudryi *et al.* 2020; Randazzo *et al.* 2020a; La Rosa *et al.* 2020; Wurtzer *et al.* 2020a), lo que constituye un conjunto importante de fuentes que apuntan a la dispersión del virus a través del agua, el suelo, el aire y otros compartimentos medioambientales (Núñez-Delgado 2020; Setti *et al.* 2020a; Parida *et al.* 2023).

La supervivencia del virus de hasta 21 días en diferentes tipos de superficies (Chin *et al.* 2020; Doremalen *et al.* 2020; Kasloff *et al.* 2021) y de 25 día a 5 °C en agua y aguas residuales, favorece la contaminación de las fuentes acuáticas (Shutler *et al.* 2020). Este comportamiento origina una amplia dispersión de la infección en aguas superficiales, utilizadas con frecuencia en países poco desarrollados.

La vigilancia e inspección de las aguas residuales, también conocida como Epidemiología de Aguas Residuales (EAR), podría estimar con precisión la presencia del SARS-CoV-2 en estos sistemas (Daughton 2020a; Wiginton y Boehm 2020). Hay que tener en cuenta, que en países subdesarrollados la falta de sistemas adecuados de tratamiento de aguas residuales hace que las aguas no tratadas se viertan directamente a las aguas superficiales, lo que representa un serio peligro para la población (Kasloff *et al.* 2021), por ello la EAR permitirían su vigilancia y la estimación del riesgo viral de las poblaciones críticas (Li *et al.* 2022).

El conocimiento de la presencia de SARS-CoV-2 en estas aguas permitiría, además, estimar el alcance de las infecciones de COVID-19 que se produzcan (Medema *et al.* 2020; La Rosa *et al.* 2020a; Wurtzer *et al.* 2020a). Por tanto, la EAR va a proporcionar información sobre el número de individuos sintomáticos, asintomáticos y presintomáticos en un área concreta (Daughton 2020; Wiginton y Boehm 2020), y la vigilancia de las aguas y aguas residuales va a limitar la posibilidad de propagación del SARS-CoV-2 a través de dichas fuentes (Daughton 2020; Wiginton y Boehm 2020). Son muy numerosas las opiniones, estudios y publicaciones sobre el SARS-CoV-2 y otros coronavirus en el medio ambiente. Generalmente se considera su presencia en aguas, aguas residuales, lodos de depuradoras (Foladori *et al.* 2020; Gormley *et al.* 2020; Núñez-Delgado 2020), en el aire y partículas atmosféricas, en bivalvos, mamíferos marinos y domésticos, y otros animales. Considerando su transmisibilidad (Heller *et al.* 2020; Hindson 2020; Mahabee-Gittens *et al.* 2020), estabilidad y persistencia (Kampf *et al.* 2020a; Scheller *et al.* 2020), análisis (Ahmed *et al.* 2020a; La Rosa *et al.* 2020a; Bofill-Mas y Rusiñol 2020; Farkas *et al.* 2020a; Haramoto *et al.* 2018; Jalandra *et al.* 2020a; Michael-Kordatou *et al.* 2020), epidemiología de aguas residuales (Michael-Kordatou *et al.* 2020; Bivins *et al.* 2020; Daughton 2020a; Daughton 2020b; Farkas *et al.* 2020b; Hata y Honda 2020; Naddeo y Liu 2020; Sims y Kasprzyk-Hordern 2020) y las estrategias de eliminación, inactivación y desinfección del virus (Chauhan 2020; Kamp 2020b; Kamp *et al.* 2020c). Pero es conveniente considerar todos estos enfoques de manera conjunta, considerando además otros focos de transmisión, como el aire y las partículas en suspensión, con objeto de sacar conclusiones generales en la defensa contra esta pandemia, apoyándose, además, en el conocimiento acumulado sobre otros coronavirus análogos, como SARS y MERS.

El vínculo evidente entre los factores ambientales (contaminación del aire, exposición a sustancias químicas, factores climáticos y urbanísticos) y la susceptibilidad, severidad y poder de transmisión del COVID-19, debe abordarse de forma rigurosa. Se ha comprobado que el virus nos afecta a través de cuatro mecanismos interconectados: las condiciones preexistentes con relación a la enfermedad, el deterioro del sistema inmune, el transporte y supervivencia viral, y el aumento de la exposición viral. Tanto los datos existentes, como las cuestiones metodológicas dificultan la investigación de estas relaciones, incluida la dependencia de datos aproximados de vigilancia de COVID-19; lagunas en los estudios mecanicistas; y el predominio de diseños ecológicos. En base a todo ello, Weaver *et al.* (2022), han evaluado la solidez de la evidencia de las relaciones entre el medio ambiente y el COVID-19, discutiendo las acciones ambientales que podría afectar simultáneamente la pandemia de COVID-19, los determinantes ambientales de la salud, y las diferentes respuestas desde el punto de vista de la salud. También es necesario considerar el efecto del tipo de entorno urbano y los factores humanos a diferentes escalas: país, estado, región, ciudad y distrito urbano. Los factores determinantes se pueden dividir en siete categorías: densidad de población, uso del espacio, transporte y movilidad, condiciones de vivienda, factores demográficos, factores socioeconómicos y factores relacionados con la salud. Es importante tener en cuenta el hacinamiento, el uso del transporte público, la proximidad a los espacios públicos, la proporción entre servicios de salud y población, los niveles de pobreza y la proporción de minorías y poblaciones vulnerables, que son importantes factores en la propagación de la propagación de la pandemia (Alidadi y Sharifi 2022).

Para tener una visión global del problema, Jakariya propone establecer un análisis correlacional sobre la presencia del virus en diferentes países, considerando su evolución en relación con las medidas de vigilancia tomadas al respecto (Jakariya *et al.* 2022; Parida *et al.* 2023), aplicando para ello modelos matemáticos (Parida *et al.* 2023).

Finalmente, algunos autores (Hammad *et al.* 2023), observando las consecuencias de la pandemia causada por el COVID-19, desde marzo de 2020 a la actualidad afirman que la contaminación ambiental se ha reducido como consecuencia del confinamiento de la población, pero las consecuencias negativas, además del drama humano causado por la pandemia, han sido muy importantes. El COVID-19 empujó a muchas personas a la pobreza, aumentando los riesgos de seguridad alimentaria al aumentar los precios reducirse los ingresos que ha llevado a numerosas familias a reducir el consumo de alimentos en términos de cantidad y calidad. COVID-19 también ha afectado a diversos sectores, como la horticultura, la pesca, los animales domésticos y la agroindustria. Asimismo, Vadiati *et al.* (2023) remarca el papel esencial del medio ambiente como receptor de la pandemia del COVID-19, afirmando que hay que considerar cuatro componentes fundamentales con relación al mismo: la contaminación del aire, epidemiología y transmisión del virus, aguas y aguas residuales, y normativas medioambientales, y que este último aspecto está ganando una especial relevancia. Otros aspectos por considerar son la gestión de los residuos, sostenibilidad, gobernanza, papel de los ecosistemas y cambio climático. Lo que nos lleva a la necesidad de abordar estudios globales y multidisciplinares.

1. VIRUS Y PANDEMIA

La actual pandemia causada por el nuevo coronavirus COVID-19, que cursa con importantes problemas respiratorios (*severe acute respiratory syndrome*-SARS), está provocando problemas sin precedentes en la salud pública y la economía en el primer tercio del siglo XXI. En general, un virus es un agente infeccioso (un parásito no celular) con material genético (ya sea ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), dentro de una capa de proteínas (cápside). En el caso del COVID-19, se trata de un virus con envoltura, pleomórficos o esféricos, que presentan ARN como genoma y cuyo tamaño oscila entre los 80 a 120 nm de diámetro. La cápside está formada por subunidades denominadas capsómeros, estructurados según un patrón que forma una capa impenetrable, que protege al ácido nucleico, dándole una forma determinada (Angelescu y Linse 2008). Algunos virus poseen una envoltura de fosfolípidos y proteínas que mimetiza la membrana celular de la célula huésped, rodea la cápside y ayuda a proteger el virus del sistema inmune del huésped. También pueden incorporar moléculas receptoras capaces de unirse a las células huésped, favoreciendo la infección. Este poder infeccioso suele potenciarse mediante una serie de espículas de glicoproteínas, que le ayuda a unirse al huésped (Cheng *et al.* 1995). Los virus dependen de la maquinaria bioquímica de las células que infectan, en las que inyectan su información genética para que se exprese en forma de proteínas (Gale *et al.* 2020). La enzima angiotensina es el receptor del huésped que se une a las espículas del COVID-19, para facilitar la entrada del virus en las células del huésped donde se replica, especialmente en los pulmones, aunque también puede afectar al corazón, intestinos, vasos sanguíneos y músculos (https://theconversation; Ge *et al.* 2013; Amirian 2020; Xu *et al.* 2020; Gu *et al.* 2020). La envoltura permite al virus salir del huésped utilizando la maquinaria celular del mismo y aumenta su capacidad de empaquetamiento en partículas, utilizando proteínas virales adicionales. Además, oculta los antígenos de la cápside de los anticuerpos circulantes y le confiere una mayor flexibilidad y persistencia estructural (Crawford 2002). La mayoría de las infecciones zoonóticas humanas están relacionadas con la envoltura de los virus y la elección de los huéspedes varían dependiendo de las proteínas de su superficie (Wisskirchen *et al.* 2014).

Los brotes del COVID-19 han evidenciado la vulnerabilidad global de la población a enfermedades emergente e infecciosas (Carroll *et al.* 2018). Las actividades antropogénicas y el consumo de recursos sin precedentes, debido al crecimiento explosivo de la población, está causando un desajuste ecológico que provoca estrés en los ecosistemas, lo que se considera como uno de los factores causantes de este tipo de epidemias/pandemias. Se ha estimado que existen alrededor de 1,67 millones de especies virales en la Tierra, de las cuales un 40% puede infectar a los seres humanos, debido al aumento creciente de las interacciones y agresiones del hombre con la naturaleza primigenia (Carroll *et al.* 2018; https://sustainabilitycommunity). La tasa de transmisión viral zoonótica entre humanos se está acelerando, debido al incremento en la huella ecológica global que conduce a un aumento no lineal del riesgo de pandemia (Jones *et al.* 2008; Geoghegan *et al.* 2016; http://nautil.us/).

2. LOS VIRUS INTESTINALES. UNA GRAN AMENAZA PARA EL MEDIO AMBIENTE

La presencia de coronavirus (CoV) en las heces ya se conocía antes del brote de la pandemia causada por el COVID-19 (Leung *et al.* 2003; Xu *et al.* 2005; Corman *et al.* 2014; Kim *et al.* 2016a), aunque el material genético viral detectado en las heces no indica necesariamente la presencia de viriones infecciosos viables (Amirian 2020; De Graaf *et al.* 2017). La replicación de SARS-CoV-1 se detectó en el tracto intestinal de los pacientes junto con a sus heces (Leung *et al.* 2003). El virus SARS-CoV-1 que se encontró en cultivos, fue también detectado en la orina junto con muestras de heces durante un período más largo (29-36 días) indicando su persistencia en las excreciones del paciente (Xu *et al.* 2005). El SARS-CoV-1 tiene un 82% de homología genética con el SARS-CoV-2, en un subconjunto de los pacientes (Amirian 2020; Xu *et al.* 2005; Cheng *et al.* 2004], lo que permite establecer comparaciones interesantes entre ambos virus. Todo ello demuestra el interés de considerar la ruta infecciosa fecal-oral (Achak *et al.* 2021). Los pacientes infectados con SARS-CoV-2 manifestaron síntomas gastrointestinales como malestar abdominal, sangrado, náuseas/vómitos, y diarrea, además de la infección respiratoria (Yeo *et al.* 2020; Amiriam 2020; Wang *et al.* 2020), especialmente en personas mayores (Liu *et al.* 2023). Los epitelios gástrico, duodenal y rectal mostraron positividad para el receptor ACE2 y la proteína de la nucleocápside, lo que proporciona evidencia de infección gastrointestinal por SARS-CoV-2 (Xiao *et al.* 2020). La expresión de ACE2 es elevada en el esófago superior, y las células epiteliales estratificadas y enterocitos absorbentes de íleon y colon, lo que define bien al sistema digestivo como ruta de transmisión potencial para la infección por SARS-CoV-2 (Zhang *et al.* 2020c). El estudio de biopsias (colonoscopia/autopsia) en muestras de intestino delgado y grueso mostró la presencia del virus y además su persistencia en las muestras de heces durante más de 70 días después del inicio de los síntomas (Kitajima *et al.* 2020).

Asimismo, se detectó ARN del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias, heces y sangre de pacientes (Wang *et al.* 2020).

3. PRESENCIA DEL SARS-COV-2 EN AGUAS, AGUAS RESIDUALES Y LODOS DE DEPURADORAS

El aporte viral de la orina y las heces es probablemente el mayor aporte de ARN procedente de virus a las aguas y aguas residuales. En este sentido, se estima una carga de 0,56 a 11,3 billones de genomas de SARS-CoV-2 por persona infectada por día a las aguas residuales (Hart y Halden 2020). Los aportes de ARN por coronavirus se han comprobado previamente con SARS-CoV y MERS-CoV estudiando las heces (Corman *et al.* 2016; Leung *et al.* 2003), de esta manera se conoce el número de copias en las mismas, que se encuentran en el rango de 10^7 a 25.000 copias de ARN de SARS-CoV por ml en caso de heces y orina, respectivamente (Hung *et al.* 2004). En el caso del SARS-CoV-2 se ha comprobado un aporte del 27-89 % de ARN cuando los pacientes excretan heces e hisopos anales/rectales (Tang *et al.* 2020; Wölfe *et al.* 2020; Cai *et al.* 2020; Holshue *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2020b). Otros estudios revelan la presencia de cantidades del orden de 10^8 copias de ARN virales por gramo de heces (Wölfel *et al.* 2020; Lescure *et al.* 2020; Pan *et al.* 2020). Esta contribución de ARN de SARS-CoV-2 fecal pueden durar hasta siete semanas desde la aparición de los primeros síntomas (Cai *et al.* 2020; Xiao *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020a), lo que indica la importancia de esta. La emisión de ARN por heces se encontró en el 81,8 % de los casos, incluso después que los pacientes dieran resultados negativos en el test que usa hisopos para obtener frotis de garganta (Ling *et al.* 2020). Asimismo, se ha encontrado ARN de SARS-CoV-2 en las heces de pacientes asintomáticos (Tang *et al.* 2020; Mizumoto *et al.* 2020; Nishiura *et al.* 2020).

También se ha encontrado presencia de coronavirus en aguas residuales (Hung *et al.* 2004; Leung *et al.* 2003), a la cuales llega el SARS-CoV-2 por la orina y las heces. La ruta fecal-oral puede ser importante para la transmisión del virus, por lo que esta vía debe incluirse en futuros estudios medioambientales para establecer las condiciones que favorezcan esta vía de infección (Yeo *et al.* 2020). Además de las consecuencias de la elevada carga viral de SARS-CoV-2 en las aguas, las contramedidas para combatirla pueden tener también efectos indirectos asociados a los métodos de desinfección utilizados en el tratamiento de dichas aguas que pueden alterar su calidad, con consecuencias negativas para las personas, organismos acuáticos y medio ambiente en general (Teymoorian *et al.* 2021). Es importante disponer de métodos eficientes detectar la presencia del SARS-CoV-2 en las aguas residuales, lo que se hace normalmente mediante la medida de su RNA en las fracciones sólida y líquida de dichas aguas. Por ello, se han llevado a cabo estudios interlaboratorio con diversas plantas de tratamiento, en las que tanto los sólidos sedimentados primarios como muestras de aguas afluentes sin tratar, se estudiaron para cuantificar la presencia del RNA del COVID-19. Las concentraciones de ARN tanto en los sólidos sedimentados como en los afluentes se correlacionaron bien con los niveles de incidencia de COVID-19 en las redes de alcantarillado representativas de la aparición de la enfermedad (King *et al.* 2022)

La presencia del virus en aguas residuales y otras fuentes acuáticas apuntan también hacia su transmisión por aerosoles contaminados procedentes de los residuos sólidos de estas aguas (Heller *et al.* 2020; Hindson 2020; Foladori *et al.* 2020; Gupta *et al.* 2020; Sehmi y Cheruiyot 2020), aspecto que se tratará en el apartado 5. Pudiendo señalarse tres posibles vías primarias de transmisión (Heller *et al.* 2020), como el contacto directo con aguas contaminadas, la participación de determinados vectores como los insectos, o a través de superficies en contacto con aguas contaminadas (Heller *et al.* 2020).

Otro foco potencial de presencia y transmisión del COVID-19 son las piscinas de rehabilitación o recreo (Cahill y Morris 2020; Romano-Bertrand *et al.* 2020), mediante el contacto directo o la vía fecal-oral (Romano-Bertrand *et al.* 2020). La transmisión del SARS-CoV-2 en los baños públicos y piscinas demuestra la importancia de realizar análisis sistemáticos de la posible presencia del virus en estas instalaciones y el mantenimiento de la distancia social, junto a un eficiente control de las medidas de desinfección para controlar posibles transmisiones. Todos estos estudios muestran la correlación entre el número de casos de COVID-19 y la cantidad de fragmentos de ARN de SARS-CoV-2 presentes en este tipo de muestras (Medema *et al.* 2020a).

Por tanto, el medio ambiente y nuestro hábitat constituye un receptor esencial, en procesos pandémicos, como el representado por el COVID-19 de ahí el interés de revisar las aportaciones proporcionadas por los investigadores en este respecto, para conocer las fortalezas y debilidades existentes para afrontar la pandemia de COVID-19, sobre una base medioambiental (Vadiatil *et al.* 2023). No obstante, ninguno de estos estudios aborda el problema desde un enfoque bidireccional COVID-19/medio ambiente. Debiendo considerarse cómo se afectan entre sí, en el sentido de que no solo hay que considerar la presencia del virus en el medio ambiente y como combatirlo, sino que esas medidas sean sostenibles desde un punto de vista medioambiental (Ekanayake *et al.* 2023).

En los siguientes apartados se consideran de forma concreta la presencia del COVID-19 en los sistemas acuáticos-medioambientales más importantes.

3.1. Aguas residuales

La presencia de CoVs en aguas residuales ha sido comprobada en diversos estudios (Medema *et al.* 2020a; La Rosa *et al.* 2020a; Gale *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020a; Wang *et al.* 2005a; Bibby *et al.* 2011; Bibby y Peccia 2013; Alexyuk *et al.* 2017; Blanco *et al.* 2019; Wutzer *et al.* 2020b) (tabla 1 en la página siguiente). Se ha comprobado la presencia del SARS-CoV-1 en los desagües procedentes de hospitales durante un brote de dicho virus, y comprobar el efecto de un proceso de desinfección, teniendo en cuenta el aporte de heces y orina de pacientes sintomáticos (Wang *et al.* 2005a). Por otro lado, se han estudiado muestras de lodos de los afluentes y efluentes de una planta de tratamiento, considerando la presencia de diversos coronavirus como HCoV 229E y HKU1 mediante un estudio metagenómico. Los resultados demostraron la presencia de los CoV en un 83 %, con prevalencia del HKU1 (Bibby y Peccia 2013), siendo la abundancia relativa de la carga viral mayor en las muestras de afluente que en las de efluentes. Los estudios posteriores, realizados a nivel mundial, en la actual pandemia del SARS-CoV-2, han corroborado la presencia del virus en este tipo de aguas (Ahmed *et al.* 2020; Medema *et al.* 2020a; La Rosa *et al.* 2020a; Wu *et al.* 2020; Blanco *et al.* 2019; Wurtzer *et al.* 2020b) (tabla 1). Un dato muy interesante es que el COVID-19 se detectó tres semanas antes de confirmarse el primer caso en personas, lo que lo convierte a esta metodología en un buen sistema de alerta temprana. Otro dato comprobado es que cuando aumenta la circulación del virus en la población también aumenta la carga del virus en la red de alcantarillado (Medema *et al.* 2020a). La presencia de disolventes y detergentes en las aguas residuales puede afectar a la envoltura del virus y por tanto a su persistencia (Gundy *et al.* 2009; Haramoto *et al.* 2020; Quilliam *et al.* 2020).

3.2. Aguas

En las aguas superficiales y subterráneas, así como en la red de suministro de agua, y muestras de lodos, se detecta, generalmente, la presencia de virus entéricos (Xagoraraky *et al.* 2014). En las aguas superficiales (ríos, lagos y pantanos) se han detectado 37 familias virales con un material genético relacionado con bacteriófagos y la mayoría de las secuencias de familias de Coronaviridae, Reoviridae y Herpesviridae (Alexyuk *et al.* 2017). Las plantas de tratamiento de aguas también son susceptibles de contaminación viral con la posibilidad de transmitirla posteriormente a la red de distribución de agua, si el virus no está totalmente desactivado (MacLellan *et al.* 2020). En las aguas superficiales, los virus están expuestos a factores desactivadores, como la luz solar, substancias químicas oxidantes y la acción depredadora de los microorganismos (MacLellan *et al.* 2020). El tiempo necesario para desactivar el virus en pruebas realizadas en agua pura y agua residual sedimentada y pasteurizada es de varios días, lo que constituye un problema añadido en esta vía potencial de transmisión (Qu *et al.* 2020; Casanova *et al.* 2009).

3.3. Plantas de tratamiento de aguas residuales

En general, en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDARs) se desarrollan una gran densidad y diversidad de virus (Petrovich *et al.* 2019). De los virus entéricos humanos, el rotavirus es el más persistente en los efluentes finales de las plantas de tratamiento, encontrándose hasta 105 copias de su genoma por litro en un elevado porcentaje de muestras (Osuolale y Okoh 2017). Los CoV persisten en las aguas residuales primarias durante más tiempo que en las secundarias, debido a la presencia de sólidos en suspensión (Gundy *et al.* 2009). La transmisión de los CoV en medios acuáticos es menos importante debido a su inactivación a temperaturas ambiente (Gundy *et al.* 2009). No obstante, se ha detectado ARN del SARS-CoV-2 durante 6 días en diversas plantas de tratamiento de agua, lo que refleja su persistencia en dicho medio (Blanco *et al.* 2019). Otros factores que afectan la persistencia de los coronavirus en aguas residuales son la población de microorganismos indígenas (Pinon, A. y Vialette 2018; Rzeżutka y Cook 2014) y la temperatura ambiente, comentada previamente, así como el pH del medio si este se aleja de la neutralidad (Graiver *et al.* 2009). Los virus sobreviven en los EDARs absorbidos o unidos de alguna forma a las superficies de los sólidos en suspensión de las aguas, originando lodos y biosólidos cargados de virus. En este sentido, la afinidad del SARS-CoV-2 por los biosólidos de la línea de alcantarillado es un indicador de incidencia, ya que actúan como concentradores de material genético de dicho virus (Balboa *et al.* 2020), cuya envoltura se adsorbe en la fracción sólida de las aguas residuales, la cual representa el 26 % de su masa).

No obstante, como los biosólidos no se eliminan, ya que tienen diversos usos y aplicaciones, pueden contribuir a la difusión y transmisión vírica. Según su tipología, los biosólidos se clasifican en Clase A libre de patógenos y Clase B con un cierto contenido de patógenos (USEPA 2003), los cuales a su vez tienen distintos usos, como jardinería para biosólidos de Clase A, y terrenos agrícolas y forestales para biosólidos de Clase B, que pueden

Tabla 1. Presencia de coronavirus en aguas residuales

Virus	Muestra	Matriz medioambiental	Detección	Comentarios	Referencia
SARS-CoV-1	Heces de pacientes sintomáticos de dos hospitales	Agua residual de dos hospitales con pacientes SARS	RT-qPCR	— Se encontró RNA de SARS-CoV agua residual antes de la desinfección y en un hospital después de la desinfección — No se detectó SARS-CoV-1 infeccioso — En las muestras se detectó RNA de SARS-CoV-1 infeccioso — No se detectó virus infeccioso en muestras de heces	Wang *et al.* 2005
Coronavirus Humano 229E HKU1	Virome	Biosólidos de clase B de plantas de tratamiento de agua	PCR	— Se detectaron 9 secuencias de 229E 1 de HKU1 — Se detectaron virus patogénicos humanos (Coronavirus y Parechovirus en biosólidos) — Los virus que se detectaron eran patógenos transmisibles medioambientalmente (Parechovirus, Adenovirus, Coronavoris y Aichi virus) y virus asociados a infecciones humanas crónicas (Herpevirus y Hepatitis C virus)	Bibby *et al.* 2011
SARS-CoV-2		Agua residual Agua de desecho de planta de tratamiento	RT-qPCR RT-qPCR	— SARS-CoV-2 en aguas residuales — Media de 170 a 1090 personas infectadas — Demuestra la capacidad de medir SARS-CoV-2 en plantas de tratamiento — La epidemiología de aguas residuales evalúa la población y la prevalencia del SARS-CoV-2	Ahmed *et al.* 2020a Wu *et al.* 2020a
SARS-CoV-2		Aguas de planta de tratamiento	RT-qPCR	— Evaluación positiva de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en el gen viral E — Confirmación positiva de SARS-CoV-2 en el gen viral RdRp	Wurtzer *et al.* 2020b
SARS-CoV-2	Fragmentos del gen de la proteína de la microcapside (N1-3) Fragmento del gen E de la proteína de la cubierta del virus	Aguas residuales (7 puntos)	RT-qPCR	— Se detecta SARS-CoV-2, 3 semanas antes de la diagnosis del primer caso — Se detectaron los fragmentos N1, N3 y E — Se recomienda la vigilancia de las aguas residuales para el control del virus en la población	Medema *et al.* 2020a

contener un número relativamente grande de virus tanto con envoltura como sin ella (Wong *et al.* 2010). Como ejemplo pueden citarse el CoV, Herpesvirus, Torque Teno virus y Parechovirus) (Bibby y Peccia (2013); Bibby *et al.* 2011).

Los sedimentos de las EDARs pueden funcionar como reservorios entéricos de virus y estos pueden sobrevivir durante varios meses en el suelo y aguas subterráneas, siempre que las temperaturas sean bajas y los suelos estén húmedos, aumentando el riesgo de contaminación

del agua (Xagoraraki *et al.* 2014). Por ello, se ha dedicado una especial atención en evaluar la capacidad de tratamiento de las EDAR para la eliminación del genoma del SARS-CoV-2 (tabla 1). Se detectó ARN de SARS-CoV-2 en muestras afluente de aguas residuales y en muestras tratadas secundariamente, mientras que no se detectó en muestras de efluentes de EDAR, lo que indica que las plantas de tratamiento son capaces de eliminar el material genético del SARS-CoV-2 (Balboa *et al.* 2020; Randazzo *et al.* 2020a; Or *et al.* 2020; Rimoldi *et al.* 2020).

4. PRESENCIA DEL SARS-COV-2 EN EL AIRE

Una de las consecuencias de la pandemia del COVID-19 ha sido despertar claramente la conciencia sobre el papel e importancia de los aerosoles en la transmisión de los virus, que hasta ahora solo se había considerado superficialmente (Tang *et al.* 2021) Una de las cuestiones a considerar ha sido despejar la confusión asociada a la terminología tradicional utilizada para designar a las partículas que pueden transmitir patógenos, como «gotitas» (*droplet*), «aerotransportadas» (*airborne*) y «nucleo de gotitas» (*droplet nuclei*), lo que ha llevado a malentendidos sobre el comportamiento físico de estas partículas. En general, cuando se inhalan partículas, independientemente de su tamaño y nombre, se está respirando aerosoles, no obstante, la distancia de la fuente es importante, ya que los aerosoles entre dos personas están mucho más concentrados a corta distancia. Las personas infectadas con SARS-CoV-2 producen muchas pequeñas partículas respirables cargadas de virus cuando exhalan. Una parte de estas partículas serán inhaladas inmediatamente por las personas con las que se está conversando (< 1m) mientras que el resto se dispersa para ser inhaladas a distancias mayores (2m). Tradicionalmente, a las partículas mayores se les llaman «gotitas» y a las menores «núcleo de gotitas», pero en definitiva son aerosoles, ya que se inhalan directamente del aire. Las gotas pequeñas se evaporan rápidamente formándose residuos de las gotas (viriones), formados por agregados de virus, proteínas y sales minerales.

La pregunta que debemos hacernos es ¿el tamaño de la gota es importante? Cuando ya se han establecido medidas de prevención, realmente no es importante, ya que al usar mascarilla y mantener la distancia de seguridad, así como reducir la ocupación en interiores, se impiden las rutas habituales de transmisión, ya sea a través del contacto directo con superficies o gotas, o por inhalación de aerosoles. Sin embargo, un aspecto fundamental es la necesidad de asegurar la ventilación, ya que las partículas suspendidas más diminutas pueden permanecer en el aire durante horas y constituyen una ruta importante de transmisión.

Una segunda medida de protección importante es asegurar la calidad de la mascarilla, que permita una protección efectiva frente a la inhalación de los aerosoles, especialmente de las partículas de mayor tamaño. Sin embargo, ambas medidas filtración/ventilación del aire y el uso de la mascarilla con complementarias y necesarias, ya que las partículas más finas pueden encontrar acceso a nuestra respiración por los huecos que deja la mascarilla. Otras vías de acceso del virus mediante partículas de mayor tamaño que recorren distancias mayores y alcanzan nuestros ojos, fosas nasales o labios son menos probable (Chen *et al.* 2020). Por otro lado, el volumen de aerosoles se incrementa, y por tanto la transmisión del virus, si se tose, estornuda o incluso canta (Schivjen *et al.* 2021). A pesar de la eficiente capacidad protectora de las mascarillas, cuyo uso ha sido bien acogido por el público en general, su uso masivo también puede generar problemas medioambientales y de bioseguridad, ya que el uso inadecuado de las mascarillas puede transferir los patógenos que contengan al medio ambiente; además, las fibras de polipropileno con las que se fabrica pueden agravar la contaminación global por plásticos, de ahí el interés de reciclarlas y extender temporalmente su uso, y sobre todo adoptar medidas tanto de índole tecnológicas, cómo uso eficiente de materias primas que prolonguen la vida útil de las mascarillas y permitan su biodegradación, cómo de control adoptando criterios industriales más estrictos y clasificación adecuada de los residuos (Chen *et al.* 2022). Estos mismos planteamientos pueden trasladarse a todos los equipos de protección personal (Hasan *et al.* 2023)

Otro aspecto por considerar es que la transmisibilidad del virus mediante aerosoles es diferente en interiores y en exteriores, ya las condiciones de dispersión y transporte son diferentes, así como el número de focos potenciales (personas infectadas), y la influencia de factores meteorológicos como la luz UV o la temperatura que puede deteriorar el virus reduciendo su tiempo de vida en la atmósfera (Belosi *et al.* 2021). Además, los aerosoles cargados de virus (viriones) pueden también interaccionar con la materia particular de la atmósfera (PM) que contribuyen a su deterioro. Estos viriones tienen velocidades de sedimentación bajas y permanecen suspendidos en el aire, lo que favorece la interacción con las PMs. Por otro lado, Setti y col (Setti *et al.* 2020b) afirma que el ARN del SARS-CoV-2 puede estar presente en las PMs, y en condiciones de estabilidad atmosférica y elevada concentración de estas partículas, formar agrupaciones que reducen su coeficiente de difusión e incrementan la persistencia del virus en la atmósfera, aunque esta hipótesis debe ser probada. Además, las PMs del aire induce inflamación en las células pulmonares y la exposición a PMs podría aumentar la susceptibilidad y la gravedad

de los síntomas del paciente con COVID-19 (Comunian *et al.* 2020).

Especial atención merecen los aerosoles generados por los fumadores en sus distintas modalidades, ya que son fuentes de transmisión del COVID-19. Ello se debe a que la carga viral en los aerosoles procedentes de los cigarrillos, en su interacción con la boca y pulmones del fumador, puede sobrevivir durante horas, y depositarse sobre superficies en las que el COVID-19 permanece activo durante varios días. Por tanto, la capacidad de transmisión viral de los fumadores es importante (Mahabee-Gittens *et al.* 2020; Avino *et al.* 2018), teniendo además en cuenta que los aerosoles que se originan superan ampliamente la distancia de seguridad, establecida como distancia social.

Por otro lado, son de gran interés los estudios relacionados con la persistencia del virus en el interior de las viviendas, teniendo en cuenta cómo operan los sistemas de calefacción, ventilación y aire acondicionado. Lo que puede ayudar a la construcción de instalaciones que reduzcan las infecciones transmitidas por el aire (Lin *et al.* 2023).

5. PERSISTENCIA DEL VIRUS

En general, la persistencia del virus en un determinado ambiente es esencial para conocer su transmisión potencial. Sin embargo, los datos existentes sobre la persistencia del COVID-9 en los diversos componentes ambientales son limitados (tabla 2). Para transferir el virus a través del ciclo del agua este debe persistir en los residuos y mantener su poder infeccioso (McLellan *et al.* 2020). La persistencia de CoV en aguas residuales (tabla 1) se ha estudiado a diferentes temperaturas usando bacteriófagos como indicadores (Gundy *et al.* 2009; Casanova *et al.* 2009; Wang *et al.* 2005b; Ye *et al.* 2016). Los bacteriófagos comparten propiedades morfológicas y biológicas con los virus entéricos, lo que permite comparaciones equivalentes (McMinn *et al.* 2017). La temperatura es uno de los factores críticos que gobiernan la supervivencia de los virones en el medio ambiente. Se han estudiado varios tipos de aguas residuales enriquecidas con SARS-CoV-1, Human CoV (HCoV 229E) y otros CoVs equivalentes que afectan al mundo animal, como el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV), el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) y el virus de la hepatitis murina A59 (MHV), para estudiar su persistencia en condiciones de temperatura variable de 4 a 25 °C (Wang *et al.* 2005a; Gundy y Gerba 2005; Casanova *et al.* 2009; Wang *et al.* 2005b; Ye *et al.* 2016). Se ha estudiado la persistencia del SARS-CoV-1 en muestras de heces y orina, las cuales se fortificaron *in vitro* con dicho virus, asimismo se llevaron a cabo experiencias con muestras de aguas residuales hospitalarias y domésticas, y agua del grifo, comprobándose la persistencia del virus a una temperatura de 4 °C (Wang *et al.* 2005b). El SARS-CoV-1 persiste durante 2 días a 20 °C, y durante 14 días a 4 °C. Por el contrario, se encontró una mayor persistencia en muestras de orina, hasta 17 días a 20 °C, lo que se asocia al contenido de sal presente en la orina, la cual ayuda al virus a mantener la presión osmótica necesaria para su persistencia (Wang *et al.* 2005b) Por tanto, la temperatura es crítica para la persistencia del virus, la cual disminuye con el aumento de esta, según estudios realizados con otros virus CoV análogos (Casanova *et al.* 2009; Ye *et al.* 2016). Otras experiencias equivalentes, realizadas en agua (grado reactivo analítico), agua de lago y aguas residuales humanas (pasteurizadas) con coronavirus, como GEV y MHV, demostraron una disminución rápida de la virulencia vírica a 25 °C frente a 4 °C (Casanova *et al.* 2009). En otras experiencias, se incubaron aguas residuales y aguas residuales pasteurizadas, enriquecidas con MHV A59, a 25 y 10 °C (temperaturas típicas de verano e invierno) (Ye *et al.* 2016), el MHV A59 persistió durante 19 días a 25 °C en aguas residuales pasteurizadas, persistencia inferior al fago ϕ6 de la Pseudomona (53 días ± 8 h), las enterobacterias MS2 y el fago T3 (121 días ± 55 h), comprobándose que este declive es más rápido y efectivo a temperaturas más elevadas (Gundy y Gerba 2005; Casanova *et al.* 2009; Wang *et al.* 2005b; Ye *et al.* 2016). Los virus con envoltura muestran una inactivación más rápida que los que carecen de ella, los cuales persisten durante tiempos superiores a las 100 h (Ye *et al.* 2016), y el CoV es más sensible que el PV-1 debido a la presencia de envoltura y su tasa de transmisión baja por inactivación a temperatura ambiente (Gundy y Gerba 2005).

Es también importante considerar la persistencia del virus en aerosoles, aunque los estudios realizados son escasos. Según Doremalen (Doremalen *et al.* 2020) el SARS-CoV-2 persiste en los aerosoles durante 3 h a 21-23 °C y 65 % de humedad relativa. No obstante, un estudio similar de Fears y col (Fears *et al.* 2020) establece que la prevalencia y estabilidad del SARS-CoV-2 en aerosoles en las siguientes condiciones ambientales: temperatura 23 °C y 53 % de humedad relativa, en ausencia de UV, es superior a 16 h. La capacidad infecciosa del SARS-CoV-2 se mantiene durante todo este período, y una fracción menor pero constante del virus conserva su capacidad de replicación (Fears *et al.* 2020) (tabla 2). Por tanto, el virus es un patógeno activo en las partículas en suspensión durante todo este tiempo (16 h). Estos resultados demuestran que existe cierta controversia sobre la capacidad infecciosa del virus en estas matrices, pero al menos queda demostrada su patogenicidad durante varias horas.

Tabla 2. Presencia y persistencia de coronavirus en matrices medioambientales a diferentes temperaturas

Virus	Matriz medioambiental	Temp. (°C)	Persistencia	Referencia
SARS-CoV-1	heces orina agua residual de hospital agua residual doméstica agua del grifo contaminada	20 4 20 4 20 4 20 4 20 4	3 días > 17 días 17 días > 17 días 2 días 14 días 2 días 14 días 2 días 14 días	Wang *et al.* 2005b
Gastroenteritis transmisible (TGEV)	agua de calidad analítica agua de lago agua residual doméstica pasteurizada (70 °C-3 h)	23-25 4 23-25 4 23-25 4	33 días 49 días 13 días 14 días 14 días 73 días	Casanova *et al.* 2009
Hepatitis de ratón (MHV)	agua de calidad analítica Agua de lago agua residual doméstica pasteurizada (70 °C-3 h)	23-25 4 23-25 4 23-25 4	26 días ↓ 49 días 10 días no se reduce 10 días 105 días	Casanova *et al.* 2009
Peritonitis infecciosa felina (FIPV)	agua del grifo contaminada agua del grifo sin filtrar efluente primario filtrado efluente primario no filtrado efluente secundario	23 5 23 23 23 23	10,1 dias > 100 días 12,5 días 2,4 día 2,56 días 2,42 días	Gundy *et al.* 2009
Human coronavirus 229E (HCoV)	agua del grifo filtrada agua del grifo no filtrada efluente primario filtrado efluente primario sin filtrar efluente secundario	23 23 23 23 23	10,1 días 12,1 días 2,35 días 3,54 días 2,77 días	Gundy *et al.* 2009
Hepatitis murina A59(MHV) (virus con envoltura) Incubación a 25 y10 °C	agua residual agua residual pasteurizada	25 10 25 10	13 días 36 días 19 días 149 días	Ye *et al.* 2016
Fage ϕ6 Pseudomonas (virus con envoltura)	agua residual agua residual pasteurizada	25 10 25 10	7 días 28 días 53 días 146 días	
Enterobacteria fago MS2 y fago T3	agua residual agua residual pasteurizada	25 10 25 10	121 días 175 días 121 días 212 días	
SARS-CoV-2	Aerosol(humedad relativa 65 %) Aerosol(humedad relativa 56 %)	21-23 23	3 h 16 h	Doremalen *et al.* 2020 Fears *et al.* 2020

El COVID-19 se ha detectado en diversas superficies, y numerosos objetos de uso doméstico incluidos teléfonos móviles, mandos a distancia, picaportes y tiradores de puertas, mesitas de noche, inodoros, lavabos, barandillas de camas, rebordes de ventanas, rejillas de ventilación, suelo bajo las camas, y otros (Núñez-Delgado 2020; Cahill y Morris 2020; Cai *et al.* 2020b; Ong *et al.* 2020; Santarpia *et al.* 2020; Aboubakr *et al.* 2020). Por tanto, es importante conocer la persistencia del SARS-CoV-2 en superficies de objetos con los que convivimos. En la tabla 3 se recogen algunos resultados significativos obtenidos hasta la fecha. El plástico se utiliza en la fabricación de los objetos más comunes, con el inconveniente de contaminar los sistemas acuáticos (Geyer *et al.* 2017; Hale y Song 2020). Por tanto, las bolsas reusables y otros muchos productos fabricados en plástico tienen potencial para difundir el virus, ya que el SARS-CoV-2 puede sobrevivir entre 4 and 7 días en estos materiales (Chin *et al.* 2020; Doremalen *et al.* 2020). Es necesaria una eliminación adecuada de objetos de plástico de usar y tirar, como equipos de protección personal (PPEs), guantes, batas y jeringas usadas por los pacientes y sus cuidadores en instalaciones sanitarias. Se ha comprobado que el COVID-19 sobrevive durante más de 7 días en la superficie de las mascarillas quirúrgicas (Chin *et al.* 2020), persistiendo activo en objetos de uso corriente, como papel (3 h), pañuelos (3 h), objetos de cobre (8 h), cartón (2 d), tela (2 d), madera (2 d), billetes (4 d) y acero inoxidable (4 d). Sin embargo, estos estudios no reproducen bien las situaciones reales, ya que emplean un número elevado (> 10^4) de partículas de virus infecciosas sobre una superficie de estudio pequeña (Goldman 2020), y estos resultados son, por tanto, orientativos. La posibilidad de que se depositen elevadas concentraciones de partículas virales en objetos domésticos es por tanto baja (Goldman 2020), debiendo además considerarse que la exposición a la luz solar o ultravioleta afecta, drásticamente, a la supervivencia del virus

Tabla 3. Persistencia de SARS-CoV-2 sobre diferentes superficies

Matriz	Temp. (°C)	Humedad relativa (%)	Persistencia	Eliminación	Referencia
Billetes	22	65	2 d	4 d	Chin *et al.* (2020)
Cartón	21-23	65	1 d	2 d	Doremalen *et al.* (2020)
Tela	22	65	1 d	2 d	Chin *et al.* (2020)
Cobre	21-23	65	4 h	8 h	Doremalen *et al.* (2020)
Algodón	20	35-40	1 h	4 h	Kasloff *et al.* (2020)
Guantes (prod. quím.)	20	35-40	4 d	4 d	Kasloff *et al.* (2020)
Guantes (nitrilo)	20	35-40	7 d	7 d	Kasloff *et al.* (2020)
Mascarilla N95	20	35-40	14 d	21 d	Kasloff *et al.* (2020)
Mascarilla N100	20	35-40	14 d	21 d	Kasloff *et al.* (2020)
Papel	22	65	30 min	3 h	Chin *et al.* (2020)
Plástico (polopropileno)	21-23	65	3 d	4 d	Doremalen *et al.* (2020)
Plástico	22	65	4 d	7 d	Chin *et al.* (2020)
Plástico de careta	20	35-40	21 d	21 d	Kasloff *et al.* (2020)
Acero inoxidable	21-23	65	3 d	4d	Doremalen *et al.* (2020)
Acero inoxidable	22	65	4 d	7 d	Chin *et al.* (2020)
Acero inoxidable	20	35-40	14 d	21 d	Kasloff *et al.* (2020)
Capa exterior de mascarilla quirúrgica	22	65	7d	No registrado	Chin *et al.* (2020)
Capa interior de mascarilla quirúrgica	22	65	4 d	7 d	Chin *et al.* (2020)
Pañuelo de papel	22	65	30 min	3 h	Chin *et al.* (2020)
Madera	22	65	1 d	2 d	Chin *et al.* (2020)

(Naddeo y Liu 2020). Sin embargo, la presencia de materia orgánica protege a los virus de la exposición a la luz y favorece el asentamiento del virus en los sistemas acuáticos. En este sentido el SARS-CoV-2 se fija a la materia orgánica para favorecer su acumulación (Naddeo y Liu 2020), aunque la presencia de microorganismos antagonistas puede reducir la supervivencia viral (Naddeo y Liu 2020). Como se ha visto antes, la supervivencia del virus está muy limitada por la temperatura, especialmente para valores superiores a 20 °C (Collivignarelli *et al.* 2020). No obstante, se ha comprobado que el COVID-19 ha sobrevivido en la India en aguas residuales a temperaturas del orden de 40 a 45 °C (Arora *et al.* 2020; Kumar *et al.* 2020), lo que representa un dato preocupante. Por ello es necesario realizar estudios definitivos que establezcan claramente la supervivencia potencial del COVID-19 en los sistemas acuáticos en diversas condiciones.

6. RUTAS DE EXPOSICIÓN MEDIOAMBIENTAL PARA LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS

Es evidente, por los estudios publicados hasta ahora, que el tracto gastrointestinal es un lugar adecuado para la replicación del COVID-19 y desde donde se elimina por las heces (Sims y Kasprzyk-Hordern 2020; Xu *et al.* 2020). A partir de esta fuente, la transmisibilidad del SARS-CoV-2 puede ser un problema importante si se tiene en cuenta la experiencia acumulada de otros virus análogos que se dispersan mediante el agua, siguiendo una ruta fecal-oral (Wigginton y Boehm 2020; Sims y Kasprzyk-Hordern 2020; La Rosa *et al.* 2020b; Ooi *et al.* 2010). Los virus entéricos infectan el tracto gastrointestinal, se multiplican y excretan por vía fecal, contaminando el agua, los alimentos, y el aire mediante las descargas de aguas residuales, fosas sépticas, suministros de aguas y escorrentías (Gerba 2007). El grado de severidad de este proceso depende de la capacidad del virus para replicarse y sobrevivir, considerando tanto los individuos asintomáticos, que pueden infectar y contribuir a la propagación (Hemalatha *et al.* 2021; Gerba 2009), aunque solo presentan cargas bajas de SARS-CoV-2 en las muestras de heces (Lee y Hsueh 2020), como individuos infectados en los que la carga vírica en heces y orina es mucho mayor (La Rosa *et al.* 2020b; Rusiñol y Girones 2017). Debiendo tenerse en cuenta, que la persistencia de ARN viral en las heces se mantiene durante 33 días (Chan *et al.* 2020b), y que en general, los virus entéricos se transmiten en dosis muy bajas, requiriendo menos de 20 partículas virales para causar la enfermedad (Bibby *et al.* 2017).

Como consecuencia de todo lo comentado, la transmisión de virus entéricos a la comunidad por flujos de aguas residuales es, en estos momentos, un punto importante de interés y preocupación (Wigginton y Boehm 2020; Quilliam *et al.* 2020), a pesar de que la transmisión del SARS-CoV-2 por vía fecal-oral es todavía poco conocida y la información de que se dispone es limitada (Xu *et al.* 2020; Chan *et al.* 2020b; Foladori *et al.* 2020; Thompson *et al.* 2020). No obstante, esta posibilidad de propagar el virus a la población no puede ignorarse considerando la experiencia previa existente (La Rosa *et al.* 2020b; Wigginton y Boehm 2020; Amiriam 2020; Ooi *et al.* 2010; Liu *et al.* 2020). Los virus que siguen la vía fecal-oral generalmente se incorporan a las infraestructuras de agua existentes: aguas residuales, agua corriente, plantas de tratamiento, hospitales/clínicas, centros de diagnóstico, etc. y contribuyen a la transmisión. Se ha comprobado la presencia de virus entérico en aguas superficiales, aguas residuales, descargas de EDAR, pérdidas de fosas sépticas, desbordamiento de la red de alcantarillado, escorrentías e infiltración durante la lluvia, las cuales finalmente contaminan las aguas superficiales y subterráneas (Xagoraraki y Svambayev 2014).

6.1. Transmisión por la atmósfera – aerosoles cargados de virus

A la gran dispersión del SARS-CoV-2, por la interconexión de las infraestructuras de aguas residuales, comentada previamente, hay que unir la importancia del número de personas infectadas por transmisión aérea debido a la aerosolización del virus (Gormley *et al.* 2020; Workman *et al.* 2020). Los virus infecciosos, incluyendo los CoVs, pueden sobrevivir durante largos períodos fuera del organismo huésped (Peiris *et al.* 2003). La contaminación agua/agua residual también constituye un vehículo potencial para la exposición humana si se forman aerosoles cargados de virus (Casanova *et al.* 2009). Las heces infectadas transmiten además a través de aerosoles cargados de virus que se forman durante la operación de depuración (Qu *et al.* 2020). Así se ha comprobado la aparición de un brote SARS-CoV-1 en zonas residenciales próximas a un sistema de drenaje de aguas residuales defectuoso con el brote de SARS-CoV-1 (Peiris *et al.* 2003), debido al papel fundamental de las partículas de aerosol formado en la propagación del virus (Yu *et al.* 2004). El transporte de CoV por el agua incrementa potencialmente la dispersión del virus por la formación de aerosoles (Upadhyay *et al.* 2013), particularmente durante la descarga y trasporte en el sistema de flujo, estaciones de bombeo y EDARs. También, las partículas atmosféricas constituyen otra vía de transmisión vinculada a enfermedades infecciosas (Qu *et al.* 2020; Yu *et al.* 2004). Aunque el SARS-CoV-2 no es un virus muy vinculado a partículas aéreas y materia particular (PM), estas contribuyen al transporte a mayores distancias del virus y a su inhalación puede hacer que el virus alcance regiones

alveolares profundas y traqueobronquiales, donde puede incrementarse la posibilidad de infección (Qu *et al.* 2020; Arslan *et al.* 2020). Los altos niveles de materia en forma de partículas (PM) en aire contaminado aumenta la susceptibilidad de la población a síntomas serios de la enfermedad (Qu *et al.* 2020). En Italia, la alta tasa de infección por COVID-19 se ha relacionado con la contaminación del aire, especialmente en ciudades con niveles elevados de PM10 (Coccia 2020) y con períodos de contaminación superiores a los 100 días, produciéndose como consecuencia de ello un elevado número de casos, especialmente con velocidades bajas de viento. En otros estudios sobre la calidad del aire en dos regiones italianas, la Lombardía y Emilia-Romaña, se ha comprobado que la letalidad del virus alcanzó elevados niveles al tratarse de áreas altamente contaminadas (Conticini *et al.* 2020). Generalmente, las gotas respirables de mayor diámetro (> 5 µm) permanecen en el aire durante períodos de tiempo corto (Pica y Bouvier 2012; Fernstrom y Goldblatt 2013), pero las gotas pequeñas que forman aerosoles (< 5 µm) pueden persistir en el aire períodos de tiempo mucho mayores y desplazarse distancias mayores (> 1 m) (Fernstrom y Goldblatt 2013). La transmisión por inhalación de pequeñas gotas de aerosol exhalado en la respiración es importante, al permanecer en el aire de manera prolongada, vinculada al movimiento del aire (Qu *et al.* 2020). Los aerosoles de partículas con tamaño PM2.5 transmiten el virus con facilidad al tracto respiratorio (Zhang *et al.* 2020; Rychlik *et al.* 2019; Wu *et al.* 2019), lo que pudo relacionarse con el brote de SARS en Hong Kong y MERS en Corea del Sur (Kim 2016b). La dinámica de transmisión del COVID-19 sugiere una posible transmisión «grado de contaminación-humano» relacionando el poder infeccioso del virus con la mala calidad del aire (Arslan *et al.* 2020).

La carga de CoV por aerosoles procedentes de aguas residuales proporciona una ruta directa de exposición al hombre (Gundy 2009), aunque el proceso es complejo de explicar. El virus que llega al sistema de alcantarillado forma un aerosol cargado de virus (Qu *et al.* 2020) mediante mecanismos de contaminación cruzada (Gormley *et al.* 2012; Gormley *et al.* 2014), en el que participan las propias depuradoras de aguas residuales, que, al utilizar oxidación biológica para el tratamiento de dichas aguas, favorecen la formación de aerosoles en la etapa de aireación. Las emisiones de materia particular de los depósitos de aireación han demostrado que el material contenido en las aguas residuales se aerosolizan y transportan más allá de las instalaciones (Upadhyay *et al.* 2013). La posibilidad de aerosolizarse los virus se ha estudiado con el virus Ebola (MS2 and Phi6) en sistemas de depuración de aguas residuales procedentes de inodoros, depósitos de aireación y modelos a escala de laboratorio de tuberías de alcantarillado convergentes (Lin y Marr 2017). Asimismo, se han detectado Rotavirus y Norovirus en procesos de activación de lodos procedentes de depuradoras en niveles superiores a los recomendados (Pasalari *et al.* 2019). No obstante, aunque no existe una evidencia concreta sobre la dispersión del SARS-CoV-2 por el aire, es importante investigarlo y conocerlo (Gormley *et al.* 2020).

7. FACTORES MEDIOAMBIENTALES QUE INFLUYEN EN LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS

El medio ambiente constituye un receptor básico en la pandemia del COVID-19. Los factores medioambientales meteorológicos como la temperatura, la humedad y el viento tienen una gran influencia en la transmisión/infección por el virus (Pica y Bouvier 2012; Peci *et al.* 2019).

7.1. Temperatura

La temperatura favorece la inactivación de los virus entéricos en condiciones específicas (Gundy *et al.* 2009; Ye *et al.* 2016; Pinon y Vialette 2018). Se ha estudiado la supervivencia dos virus de tipo CoV (TGEV and MHV); en agua de grado a analítico, agua de lago y aguas residuales decantadas a temperatura ambiente (23-25 °C) y 4 °C durante 6 semanas (Casonava *et al.* 2009). El carácter infeccioso del virus decrece rápidamente a 25 °C, indicando el papel regulador de la temperatura en la inactivación del virus en una matriz acuosa (Gundy *et al.* 2009).

7.2. Humedad y lluvia

La relación entre la humedad relativa y la transmisión de la enfermedad depende de la persistencia de la viabilidad viral antes de infectar a individuos susceptibles (Lin y Marr 2017). El papel de la relación humedad absoluta/relativa (HA/HR) en relación con la eficiencia del virus requiere una investigación más profunda. Valores de HR inferiores al 33 % mostraron una mayor viabilidad que en los correspondientes valores intermedios de UR (Lin y Marr 2017). Los aerosoles (a nivel de la submicra) y las gotitas pequeñas (del orden de 1µL), participan activamente en la transmisión de estas enfermedades infecciosas (Lin y Marr 2017). El bacteriófago con envoltura Phi6 sobrevive bien tanto a valores de humedad relativa (UR) altos (>85 %) como bajos (<60 %), experimentando una disminución significativa de su carácter infeccioso a valores medios de UR (~60 a 85 %) (Prussin *et al.* 2018), lo que sugiere que la humedad relativa es un factor importante en el control del carácter infeccioso del virus presente en gotitas. La naturaleza no linear de la relación de

los virus de la gripe tipo A con la temperatura, la gripe tipo B con la humedad absoluta relativa, y la temperatura explica la complejidad de la influencia del medio sobre la virulencia (Peci *et al.* 2019; Osuolale y Okoh 2017). La temperatura del sistema aire/agua y la humedad relativa han demostrado una marcada influencia en la proporción de inactivación de los virus con envoltura (Casanova *et al.* 2009; Lin y Marr 2017; Kim *et al.* 2018). La transmisibilidad viral también depende significativamente de la posible precipitación del virus, las lluvias producen una mezcla de las aguas residuales y de aguas fecales, favoreciendo su descarga en las aguas superficiales y aumentando el riesgo de exposición (Donovan *et al.* 2008). El riesgo de exposición por vía fecal-oral también es problemático, especialmente cuando se defeca sin saneamiento o sin alcantarillado (Quilliam *et al.* 2020), proceso de infección que se intensifica más cuando se producen precipitaciones.

7.3. Bivalvos

Se ha comprobado que los CoV infecta a las mascotas, el ganado y animales de vida silvestre (Wong *et al.* 2019; Wang *et al.* 2019). Dependiendo de las condiciones ambientales predominantes, los animales podrían transmitir el virus en mayor o menos medida, pero esta opción debe investigarse en mayor profundidad. Varias familias virales (patógenos altamente estables) siguen siendo infecciosas y se transportan a largas distancias en el agua (Bacnick *et al.* 2020), lo que aumenta el impacto potencial cuando estas aguas residuales recuperadas se utilizan para el riego y la cría de animales. Los moluscos bivalvos se contaminan fácilmente con patógenos humanos presentes en aguas afectadas por aguas residuales municipales, y la detección de SARS-CoV-2 en heces de pacientes infectados y en aguas residuales ha llamado la atención sobre la posible presencia del virus en bivalvos. Así, el estudio de Mancusi (Mancusi *et al.* 2020) y Polo (Polo *et al.* 2021) confirman que los moluscos bivalvos pueden bioacumular SARS-CoV-2 en niveles detectables, y que pueden representar una herramienta valiosa para rastrear SARS-CoV-2 en cuerpos de agua y monitorear tendencias, brotes y diversidad viral.

8. ANÁLISIS DEL COVID-19 EN FUENTES ACUÁTICAS Y AGUAS RESIDUALES

La detección de virus entéricos en aguas residuales, aguas subterráneas/superficiales, muestras de lodo y agua potable es un desafío por la baja concentración de los virus en estas matrices, en las que puede encontrarse trazas de partículas virales o viriones en enormes volúmenes de agua, dependiendo lógicamente de la gravedad de la infección. Para una detección precisa, las muestras ambientales deben preconcentrarse utilizando métodos microbiológicos y moleculares antes de la detección. Sin embargo, la recuperación del virus mediante métodos de preconcentración es siempre compleja (Xagoraraki *et al.* 2014).

Un análisis viral típico en aguas y aguas residuales implica las siguientes etapas: toma de muestra, almacenamiento de la muestra, preparación, preconcentración-extracción, y detección/análisis (Patel *et al.* 2019). Las etapas de preparación de la muestra y preconcentración del virus son necesarias en aguas residuales sin tratar para el estudio del SARS-CoV-2 (Ahmed *et al.* 2020a; Medema *et al.* 2020a; Nemudryi *et al.* 2020; Wurtzer *et al.* 2020; Ahmed *et al.* 2020b). Los efectos de la matriz e incluso los pequeños errores en las manipulaciones de las diversas etapas del análisis, citadas previamente, como la extracción del ARN y los errores instrumentales, van a influir sobre los resultados finales (Michael-Kordatou *et al.* 2020).

8.1. Toma y preservación de la muestra

Existen varias propuestas sobre la forma de realizar la toma de muestra y su preservación para el estudio del COVID-19. En la tabla 4 se resumen los ejemplos más importantes.

En el análisis de aguas residuales se han usado tanto muestras simples como compuestas. Estas muestras se suelen almacenar a 4 °C en la oscuridad (si la conservación es por poco tiempo), sin embargo, para períodos de conservación más prolongados se recomienda el uso de temperaturas bajas, de -20/-80 °C (Michael-Kordatou *et al.* 2020). En muestreos punto a punto, la concentración solo representa la instantánea de ese punto particular, por eso es más aconsejable el uso de muestras compuestas que resumen la presencia del virus en varios puntos y proporciona una visión de conjunto sobre la concentración del ARN del virus. El volumen de muestra varía notablemente de unos investigadores a otros, estando comprendida en el intervalo de 30 ml a 2 L, por lo que es necesario diseñar un método de uso general.

8.2. Preparación de la muestra para la determinación del virus

La preparación de la muestra y su preacondicionamiento es un paso importante antes de realizar la preconcentración de la misma. El tratamiento de la muestra tiene como objetivo incrementar la extracción viral y la eficiencia en la medida de la concentración. Entre las operaciones más frecuentes tenemos la filtración, el ajuste del pH y de la salinidad. Como agentes de pre-acondicionado de

Tabla 4. Técnicas habituales de muestreo y almacenamiento para el análisis de SARS-CoV-2 en sistemas acuosos

Método de muestreo	Recipiente (volumen)	Temperatura de almacenamiento (°C)	Referencia
Muestra puntual	100-200 mL	4	Ahmed *et al.* 2020
Muestra compuesta	250 mL	4	Medema *et al.* 2020a
Muestra puntual	Plástico estéril HDPE (500-1000 mL)	4	Radazzo *et al.* 2020a
Muestra compuesta	250 mL	-20	La Rosa *et al.* 2020a
Muestra puntual		4	Wurtzer *et al.* 2020a
Muestra compuesta	1,9 L	4	Green *et al.* 2020
Muestra compuesta	Botella de plástico (2L)	-20/-80	Or *et al.* 2020
Muestra compuesta	250 ml	4	Balboa *et al.* 2020
Muestra puntual		4	Randazzo *et al.* 2020b
Muestra puntual	500 ml		Nemudryi *et al.* 2020
Muestra compuesta	500 ml		
Muestra puntual	Botella de plástico (1L)	sobre hielo	Haramoro *et al.* 2020
Muestra puntual	Polipropileno (500 ml)		Remoldi *et al.* 2020
Muestra compuesta	Polipropileno	-80	Ampuero *et al.* 2020

la muestra se suele utilizar $MgCl_2$, extracto de carne y glicina (Bofill-Mas y Rusiñol 2020).

Los procedimientos de preconcentración con sus ventajas e inconvenientes se resumen en la tabla 5. Los procedimientos más frecuentes son la precipitación/floculación (usando un floculante orgánico o la precipitación con sulfato amónico), la adsorción-elución (usando filtros cargados positiva o negativamente, y los polvos de vidrio o fibra), la ultracentrifugación, ultrafiltración, liofilización y filtración (Bofill-Mas y Rusiñol 2020; Bosch *et al.* 2006).

Para probar estas metodologías, cuando no se dispone de un virus conocido o cultivable, se utilizan virus substitutivos (subrogados) con objeto de realizar las experiencias. Así, el virus de la hepatitis murina se ha utilizado con frecuencia para estudiar la persistencia de coronavirus humanos, debido a su semejanza estructural (Ahmed *et al.* 2020b; Casanova *et al.* 2009; Patel *et al.* 2017; Ye *et al.* 2016). Una ventaja es la naturaleza no patogénica de estos virus subrogados, lo que reduce la necesidad de mantener altos niveles de bioseguridad (Ahmed *et al.* 2020b). Así, se han evaluado los métodos comunes de pre-concentración para el coronavirus SARS-CoV-2, usando como subrogado el virus de la hepatitis murina (MHV) (Ahmed *et al.* 2020b). Para cuantificar la eficiencia de la recuperación obtenida mediante los distintos métodos de pre-concentración se utiliza las técnicas PCR, en su modalidad RTqPCR. Los métodos más frecuentes para concentrar el COVID-9 de aguas residuales son la centrifugación o filtración para eliminar los restos celulares, la filtración con membrana electronegativa (Ahmed *et al.* 2920a), la ultrafiltración (Ahmaed *et al.* 2020a; Balboa *et al.* 2020; Kocameni *et al.* 2020a; Medema *et al.* 2020a; Nemudryi *et al.* 2020; Or *et al.* 2020), precipitación con polietileneglicol (PEG) (Kocameni *et al.* 2020a; Or *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020b), floculación con aluminio (Randazzo *et al.* 2020a; Randazzo *et al.* 2020b) y la ultracentrifugación (Wurtzer *et al.* 2020a; Wurtzer *et al.* 2020b). Estos métodos de concentración incrementan la presencia de ARN de 20 a 800 veces en las aguas residuales. En el caso de muestras de lodos el ARN se extrae directamente (Peccia *et al.* 2020) o el virus se eluye por precipitación de la matriz con PEG (Balboa *et al.* 2020). Los compuestos orgánicos, como los ácidos húmicos, pueden interferir en estas determinaciones (Farkas *et al.* 2020a). Como se ha comentado previamente, el volumen de muestra es otro factor importante que afecta la detección del virus. En general, para la detección de virus entéricos en aguas no tratadas, se utilizan normalmente volúmenes de muestra inferiores a 100 ml en la etapa de concentración (Haramoto *et al.* 2018), en el caso del SAR-CoV-2 el volumen utilizado suele ser de 200 ml (Ahmed *et al.* 2020b; Medema *et al.* 2020a; Menudryi *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020b; Wurtzer *et al.* 2020b; Wurtzer *et al.* 2020a). Sin embargo, si la presencia del COVID-19 es menor se precisan volúmenes superiores (Haramoto *et al.* 2018).

Tabla 5.- Ventajas e inconvenientes de los métodos de preconcentración viral

Principio de concentración	Método de concentración	Ventajas	Desventajas	Referencia
Adsorción	Todos	— Tiempo de procesamiento corto < 40 min/muestra — Eficiente para preconcentrar el virus en fase sólida o líquida — Fácil modificación de la escala hacia arriba o abajo hasta 200 ml — Se puede aplicar en el campo — Equipo simple-unidad de filtración — Procesado de múltiples muestras con unidades de filtración múltiples	— Abundantes recipientes de lavado y limpieza — Requiere ajustes de pH — En casos de elevada turbidez el equipo se obtura — Etapa de trituración con cuentas junto a kit de extracción de RNA	Ahmed *et al.*, 2020a Ahmed *et al.* 2020b
Centrifugación	Todos Particulamente Ultracentrifugación	— Relaciones de recuperación elevadas — Aplicable a muestras turbias — No precisa preacondicionamiento — Método de paso único — Eficiente para preconcentrar virus en fase líquida y sólida — Bajo coste de procesado por muestra	— Precisa equipos costosos — Sólo aplicable a pequeños volúmenes — El proceso precisa unas 3 horas — No es aplicable en el campo	Bofill-Mas & Rusiñol 2020
Filtración-adsorción	Sistema de membrana dual (fluoruro de polivilidene-PVDF + membrana HA) Filtros negativos Filtros positivos Filtros Virocap / nitroceram®	— Puede concentrar secuencialmente bacterias y virus — Las partículas mayores >45µm las separa con el filtro superior — Bajo coste — Es posible la extracción directa por la membrana — Puede aplicarse a grandes volúmenes de muestra — Puede aplicarse en el campo — Recomendado por la EPA — Es posible automatizarlo	— Grandes diferencias en la concentración viral de las muestras → vol. de filtración diferentes — No aplicable a muestras turbias y grandes volúmenes de muestras — Es necesario el acondicionamiento de la muestra — No es aplicable a muestras turbias — Coste elevado	Ahmed *et al.* 2020a; Ahmed *et al.* 2020b Bofill-Mas & Rusiñol 2020
Floculación y precipitación	 Precipitación con polietilenglicol dextan Polietilen glicol 8000	— Eficiente para muestras turbias — Componentes de bajo coste — Recomendado por la WHO en la vigilancia del polivirus — Centrifugar a 10000 g — Eficiente para la concentración viral en fase sólida o líquida — Bajo coste relativo — Se puede procesar grandes cantidades de muestra	— No es aplicable a grandes volúmenes — Puede requerir preacondicionamiento / centrifugación de la muestra	Bofill-Mas & Rusiñol 2020
Ultrafiltración	Ultrafiltración de flujo tangencial	— Eficiente para grandes volúmenes — Es posible automatizarlo	— Requiere el acondicionamiento del filtro	Ahmed *et al.* 2020a; Ahmed *et al.* 2020b; Bofill-Mas & Rusiñol 2020

8.3. Detección del virus

Para la cuantificación de ARN y ADN viral en aguas residuales se suelen utilizar técnicas basadas en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) como la PCR cuantitativa (qPCR) y la PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) (Farkas *et al.* 2020b; Haramoto *et al.* 2018). Estos métodos son útiles para la detección de pequeños segmentos del genoma viral. Los métodos PCR proporcionan, por tanto, detecciones rápidas, exactas y sensibles de hasta cinco cepas del virus en cada prueba (Jiang *et al.* 2014). Se han aplicado varias pruebas RT-qPCR para la detección del SARS-CoV-2 (Chan *et al.* 2020c; Nalla *et al.* 2020; Vogels *et al.* 2020), que han sido aplicables a estudios en aguas residuales (Ahmed *et al.* 2020; Medema *et al.* 2020a; Wurtzer *et al.* 2020a; Wurtzer *et al.* 2020b). Se ha propuesto otros ensayos basados en distintas secciones del genoma del SARS-CoV-2, que sin embargo tienen una capacidad diferente para detectar el virus (Ahmed *et al.* 2020; Medema *et al.* 2020a; Wurtzer *et al.* 2020a; Wurtzer *et al.* 2020b). Además, hay que considerar la presencia de contaminantes orgánicos en las muestras de agua, que limitan el uso de los métodos qPCR inhibiendo las enzimas polimerasas y de transcripción inversa (Farkas *et al.* 2020a).

La PCR digital (d-PCR) también se ha usado en la estimación de los virus en muestras medioambientales (Farkas *et al.* 2020b). Este método permite la cuantificación absoluta y reduce los procesos de inhibición. Sin embargo, la PCR digital es más costosa que la PCR cuantitativa. Otras técnicas emergentes son el uso de biosensores y la amplificación isoterma para la detección y cuantificación de ADN/ARN viral en muestras medioambientales. Estas técnicas proporcionan resultados en menos de una hora, se ahí la utilidad de las mismas (Farkas *et al.* 2020b).

Se han propuesto otros dispositivos analíticos basados en sistemas microfluídicos que permiten un análisis rápido y barato para detectar los virus en aguas residuales (Mao *et al.* 2020). También se han desarrollado técnicas de detección basadas en inmunoensayos, como inmunoensayos con oro coloidal, ensayos con enzimas unidas a inmunosorbentes (ELISA), inmunoensayos de flujo lateral, inmunoensayos de fluorescencia a tiempo resuelto, junto con una variedad de otros kits de detección basados en anticuerpos, que se puede adquirir comercialmente (Jalandra *et al.* 2020b). Otras técnicas analíticas, actualmente en desarrollo, son las basadas en el uso de aptámeros, las CRISPR, los inmunosensores electroquímicos, los microarrays y las basadas en polímeros impresos (Jalandra *et al.* 2020b). Sin embargo, la baja sensibilidad de estas técnicas frente a los métodos tradicionales basados en PCR representa una importante desventaja. Por otro lado, estos métodos no se han probado de forma rigurosa en el campo, por lo que las técnicas convencionales basadas en RT-qPCR son las más empleadas y las que proporcionan resultados más fiables (Ishii *et al.* 2014; Jalandra *et al.* 2020b). Más recientemente, Wang *et al.* han propuesto el uso de nanosensores para la detección del virus en el medio ambiente. El pequeño tamaño de estos componentes sensibles junto con un tiempo de respuesta rápido, alta sensibilidad y especificidad (Wang *et al.* 2023; El-Sayyad *et al.* 2023) favorece el desarrollo y aplicación de materiales funcionarizados para inactivar y prevenir la transmisión del virus.

8.4. Control de calidad de los análisis

Para asegurar la fiabilidad de los resultados es necesario aplicar métodos adecuados de control de calidad y aseguramiento de la calidad (QA/QC) a los procedimientos analíticos utilizados.

La toma de muestras debe ser representativa y hay que tomar las necesarias precauciones en las etapas de preacondicionamiento y concentración. La eficiencia de los métodos de concentración debe establecerse claramente antes de aplicarlos a las muestras reales. Solamente los métodos con elevada recuperación deben aplicarse en el análisis de aguas residuales. Es necesario establecer adecuadamente la repetibilidad y reproducibilidad del método. Con frecuencia se utilizan muestras artificiales para evaluar la detección del método y subrogados de los virus, cuando hay problemas para su cultivo (Bosch *et al.* 2006) Es necesario tener una precaución especial con las muestras de aguas residuales por su turbidez y la presencia abundante de materia orgánica que puede afectar a los resultados (Bofill-Mas y Rusiñol 2020).

Es necesario el desarrollo de métodos de referencia que permitan una correcta evaluación de la epidemiología de aguas residuales y vigilancia medioambiental. En la actualidad no existen procedimientos aceptados de elevado consenso para la detección del SARS-CoV-2 (Collivignarelli *et al.* 2020), por ello, se han empleado métodos estándar modificados. Por ejemplo, el procedimiento estándar de la WHO para la vigilancia del poliovirus (WHO 2003), se ha modificado para el análisis del ARN del SARS-CoV-2 en aguas residuales (La Rosa *et al.* 2020a). El desarrollo de métodos estandarizados de análisis para la detección de RNA de SARS-CoV-2 representaría un avance importante para cubrir el hueco de la vigilancia de aguas residuales. Estos métodos estándar deben ser también capaces de cuantificar los virus en matrices de aguas complejas y proporcionar resultados que permitan comparar las muestras que se tomen en todo

el mundo (Collivignarelli *et al.* 2020). No obstante, es necesario disponer de una estimación global de los niveles de RNA de SARS-CoV-2 en aguas residuales en el espacio y en el tiempo usando métodos diversos, tareas que han acometido Mantilla-Calderon *et al.* (Mantilla-Calderon *et al.* 2022).

9. INACTIVACIÓN DEL VIRUS

La supervivencia de los virus en la naturaleza y en los sistemas de ingeniería construidos por el hombre tiene importantes consecuencias en la salud pública (Ye *et al.* 2018), en los cuales los virus entéricos deben eliminarse o inactivarse en un 99,99 %. En general, EDARs representan una importante barrera en este sentido (Xagoraraki *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2016; Qiu *et al.* 2015; Sidhu *et al.* 2018), ya que la carga de patógenos virales que llega a las mismas procedentes de los desagües urbanos está en el rango de 10^6-10^8 GC/L (Guanina-Citosina/L) (Zhang *et al.* 2016).

9.1. Plantas de tratamiento de aguas residuales

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDARs) funcionan como auténticas barreras para evitar la transmisión de los virus. La unidad de operación de una EDAR incluye típicamente un tratamiento primario: detección, ecualización (opcional), coagulación o sedimentación (primaria y secundaria), reactor principal de lodos biológicos activados, reactor discontinuo secuencial o bioreactores de membrana operados con microambientes aeróbicos anóxicos y/o anaeróbicos, y tratamiento terciario (filtración (arena/membrana), adsorción (carbón activo) o desinfección mediante irradiación UV, cloración, ozonización, etc, así como humedales artificiales o estanques de estabilización además de la digestión anaeróbica (para estabilización de lodos). La unidad de operaciones juega un papel crucial para la eliminación del virus (Zhang *et al.* 2016). La colocación de la unidad de operaciones en una determinada secuencia depende de la calidad del flujo de entrada de agua residual, la calidad requerida para la descarga del agua tratada y el uso destinado para el agua tratada.

9.2. Procesos y tecnologías de desinfección

Las estaciones depuradoras de aguas residuales convencionales actuales no están diseñadas específicamente para eliminar virus. La unidad de desinfección es la que se ha incorporado en las instalaciones actuales para inactivar patógenos, incluidos los virus.

9.2.1. Procesos convencionales de desinfección

Los agentes más comúnmente usados en la desinfección y desactivación de los virus son los oxidantes químicos (cloro, dióxido de cloro, ozono, peróxido de hidrógeno, hipoclorito sódico y ácido paracético) y la irradiación con luz ultravioleta (UV). La irradiación solar, filtración (arena, cerámica porosa), membrana (micro/ultra/nano y ósmosis inversa), y otros, junto con los estanques de estabilización y los humedales artificiales, contribuyen a la inactivación del virus, aunque no de forma completa, dependiendo de las condiciones operativas y la naturaleza de las aguas residuales. El uso del cloro está bien establecido y permite la inactivación por oxidación del material celular del virus (Xagoraraki *et al.* 2014). En este tratamiento es importante considerar el tiempo de contacto de las células con los reactivos, la dosis, el pH, la temperatura, y la composición agua residual/agua son factores críticos que influyen en la eficiencia de inactivación del virus. El cloro tiene una gran eficiencia en la inactivación del SARS-CoV-1 (Nishiura *et al.* 2020), aunque el cloro libre residual puede generar subproductos. El empleo de hipoclorito sódico también asegura a inactivación completa del virus (Hemalatha *et al.* 2021) así como el H_2O_2 con ácido acético, pero esta mezcla oxidante tiene el inconveniente de generar radicales hidroxilos reactivos (USEPA 2003; Liberti *et al.* 1999).

El ozono también origina oxidantes secundarios de alta reactividad que producen inactivación del virus en cortos períodos de tiempo (Gomes *et al.* 2019; Xu *et al.* 2002; Wolf *et al.* 2018) lo que justifica su uso, a pesar de su naturaleza reactiva/corrosiva y del coste. Finalmente, la radiación UV (220-320 nm) es también uno de los métodos más ampliamente utilizado, por su eficiencia frente a los patógenos incluyendo los virus, aunque su eficiencia no es muy elevada y se ha comprobado la presencia de una carga significativa de virus después del tratamiento (Qiu *et al.* 2018). No obstante, su capacidad de inactivación vírica depende lógicamente del tiempo de exposición, la intensidad de irradiación, y la abundancia de partículas en suspensión/color/turbidez del agua o agua residual. La irradiación con luz UV tiene la ventaja de no requerir la adición de reactivos químicos, aunque la agregación viral induce la recombinación de genomas (virus dañados en el interior de sus células huésped) y por tanto, se reduce la inactivación viral durante el tratamiento UV (Mattle y Kohn 2012).

La desinfección solar del agua por la acción conjunta de la luz del sol y la temperatura juega un papel importante en el proceso de inactivación (Agullo-Barcelo 2013; Polo *et al.* 2018). La irradiación solar en sistemas naturales o en sistemas de tratamiento (drenajes, estabilización con estanque de algas, humedales artificiales, cuerpos de

agua, etc.) también contribuyen a inactivar en cierta medida los patógenos (Nelson *et al.* 2018).

Otra forma de eliminar patógenos es mediante una barrera física, utilizando procesos basados en el empleo de membranas, como la microfiltración (0.1-10 µm), que permite eliminar quistes de bacterias/protozoos, y la ultrafiltración (0.01-0.1 µm) y nanofiltración (0.001-0.01 µm) para la eliminación de virus (Collivignarelli *et al.* 2018). También se ha utilizado la ósmosis inversa (< 0.001 µm) que elimina los virus del agua junto con subrogados como el bacteriófago MS2 (Hornsta *et al.* 2019), y el bioreactor de membrana (RMB) sistema híbrido que integra un proceso de fango activado (ASP) con una membrana de filtración para la separación de biomasa, utilizando una configuración sumergida o de flujo lateral (Naddeo y Liu 2020; Xagoraraki *et al.* 2014). Así como ejemplo, un bioreactor de membrana trabajando a gran escala, con tamaño de poro de 0,04 µm, permite la eliminación de varios virus patógenos (adenovirus, norovirus GII, F+ coliphage) (Chaudhry *et al.* 2015).

9.2.2. Procesos emergentes de desinfección

Aunque la eliminación de los virus en aguas residuales se puede realizar mediante tratamientos convencionales, como hemos visto en la sección anterior, existen metodologías emergentes que pueden complementar a las anteriores (Naddeo y Liu 2020; Zhang *et al.* 2016; Hiep *et al.* 2023). Los sistemas de tratamiento de aguas residuales y agua potable basados en dispositivos multibarrera son eficientes para proteger contra el SARS-CoV-2 (Wigginton y Boehm 2020). Sin embargo, la posibilidad de usar sistemas específicamente dirigidos a dañar el genoma funcional va a permitir el desarrollo de mejores métodos para la diversidad de patógenos existentes (Wigginton *et al.* 2012). Los procesos de oxidación avanzados (POAs) basados en el uso de la radiación UV integran el uso de H_2O_2, Cl_2, O_3 y material funcional para facilitar la generación de radicales reactivos por fotolisis (Zhang *et al.* 2016). Los POAs emplean radiación ultravioleta monocromática de baja presión (UVC) (253.7 nm), UVC-H_2O_2, y UV-Fenton para la inactivación de subrogados entéricos en agua ultrapura y matrices sintéticas de agua residual y orina (Giannakis *et al.* 2018). También se ha integrado irradiación UV con la acción química del ácido peroxiacético (PAA) para lograr una inactivación de gran eficiencia (Lubello *et al.* 2002). Otras asociaciones son la de H_2O_2 o persulfato/monopersulfato para producir radicales hidroxilos (Lubbello *et al.* 2002) o la del ozono con fotoasistencia que permiten una desinfección de alta calidad (Gomes *et al.* 2019).

La desinfección fotocatalítica basada en su capacidad oxidativa potencial y la posibilidad de utilizar la energía solar es una alternativa muy prometedora en procesos de desinfección (Zheng *et al.* 2015; Tondera *et al.* 2015; Nam *et al.* 2019). Son numerosos los materiales que pueden utilizarse como fotocatalizadores, metales magnéticos como el Fe, Co y Ni, nanopartículas semiconductoras como óxidos metálicos dopados (TiO_2, ZnO, CuO, MgO, SnO_2, WO_3, SiO_2, Fe_2O_3, Nb_2O_3, TiO_2/CuO, Ag/TiO_2, TiO_2/Pt, Fe_2O_3/TiO_2, Au/TiO_2 y TiO_2 dopados con N, C, S), nanopartículas inorgánicas (NPs) de metales nobles (oro [Au], plata [Ag] y platino [Pt]) y nanopartículas de carbono (nanotubos de carbono [NTCs], y furellenos C60 y C70) (Yemmireddy y Hung 2017).

Las especies oxidantes que se producen penetran en la capa lipídica del virus lo que origina su inhibición o lisis (Zhang *et al.* 2019). Los procesos de inactivación viral fotocatalítica constan de tres etapas: (i) distorsión de su forma, (ii) oxidación de las proteínas, y (iii) daño genético (Li *et al.* 2016).

9.3. Mecanismos de inactivación de los virus

La extensión y el tipo de daño que se cause a un virus en la operación de inactivación, puede que elimine su capacidad de infectar, por eso es importante conocer y aplicar la estrategia de inactivación adecuada. Por ejemplo, el ARN monocatenario del SARS-CoV-2 lo hace más susceptible a la inactivación que el ARN monocatenario de los virus entéricos (Wigginton y Boehm 2020). Como es bien sabido, un virus para ser infectivo debe unirse al huésped inyectar su genoma en el interior del mismo y replicar su genoma (Wigginton *et al.* 2012). Los oxidantes y la radiación dañan las proteínas virales y los ácidos nucleicos, lo que es una acción inespecífica, pero es importante comprender bien la pérdida de funciones específicas del virus (Wigginton *et al.* 2012). La luz UV_{254nm}, el dioxígeno, y el ácido hipocloroso inhiben el correcto funcionamiento del genoma, mientras que el ClO_2 y el calor inhiben la capacidad de reconocimiento de la célula huésped y su unión a la misma (Wigginton *et al.* 2012). La inactivación por ClO_2 induce daño en las proteínas sin inhibir la función del genoma. A nivel proteico el ClO_2 es un oxidante selectivo que reacciona fundamentalmente con cisteína, tirosina, triptófano (Odeh y Margerum 2006). La radiación UV y el cloro producen rotura específica en la proteína de la cápside del virus, inhibiendo la replicación del genoma y la capacidad de inyectarlo al huésped (Wigginton *et al.* 2012). Comparando la inactivación que se logra con el ozono con la inactivación por el cloro libre, se comprueba que el cloro produce poca o ninguna pérdida de la funcionalidad del genoma, mostrando su papel específico en el daño a proteínas (Torrey *et al.* 2019). No obstante, es difícil predecir de forma segura la inactivación de los coronavirus

en soluciones acuosas o en superficies ambientales, que constituyen el medio más frecuente de propagación del virus en los lugares públicos. Por ello, Huang *et al.* (2023) han desarrollado modelos de *Machine Learning* para predecir los efectos de inactivación UV de los coronavirus en estos medios.

9.3.1. Mecanismos de inactivación de los virus con envoltura

Los virus con envoltura son menos resistentes a las condiciones medioambientales y a la inactivación que los virus sin envoltura (Sidhu *et al.* 2018; Brugnera *et al.* 2016) y se inactivan a velocidades mayores (Gundy *et al.* 2019; Ellemberg *et al.* 2016) Las operaciones de inactivación/desinfección que se emplean en los virus sin envoltura suelen ser también eficaces para los virus con envoltura (Coccia 2020). Los virus con envoltura son más susceptibles a la acción de oxidantes (Wigginton y Boehm 2020; Ye *et al.* 2018; Rice *et al.* 2007) y los desinfectantes de tipo químico dañan la cápside viral, mientras que la radiación UV afecta al ácido nucleico (Zhang *et al.* 2016). La oxidación directa con radicales reactivos daña la envoltura viral, lo que se manifiesta por la pérdida de función de los receptores (Wigginton *et al.* 2015). La envoltura no afecta la susceptibilidad de los virus a la radiación UV, ya que esta radiación altera funcionalmente al genoma (Ye *et al.* 2016). Para comprender el mecanismo de inactivación de la envoltura del virus por el cloro libre y la radiación UV se estudió un virus con cubierta modelo (*Pseudomonas* virus Phi6) (Ye *et al.* 2018) El cloro libre reacciona con las proteínas de la nucleocápsida y el complejo polimerasa y péptidos Phi6, que son más reactivos si se le comparan con los péptidos más reactivos del colifago sin envoltura MS2 (Hemalatha *et al.* 2021; Ye *et al.* 2018).

10. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS – VIGILANCIA DE ALERTA TEMPRANA DE DETECCIÓN Y DIFUSIÓN

La detección del virus en aguas residuales y de alcantarillado cuando la prevalencia del SARS-CoV-2 ha sido baja indica el papel funcional de las aguas y residuos procedentes del alcantarillado para vigilar la circulación del virus en la población (Gormley *et al.* 2012; Medema *et al.* 2020b; Lodder *et al.* 2013; Willington *et al.* 2015; Hemalatha *et al.* 2021) mediante una Epidemiología de Aguas Residuales (McLellan *et al.* 2020) Por tanto, las aguas residuales servirán, tanto como un sistema de vigilancia como de alerta temprana (Ahmed *et al.* 2020a; Medema *et al.* 2020b). La vigilancia del SARS-CoV-2 en aguas residuales, puede cuantificar la escala de infección existente dentro de la comunidad, con la ventaja de detectar el virus procedente de individuos que no han sido estudiados o son asintomáticos, potencialmente sintomáticos, presintomáticos, o con síntomas suaves (Hemalatha *et al.* 2021; Lodder *et al.* 2012; Nelson *et al.* 2008; Osuolale y Okoh 2017). De esta forma se puede disponer de un método sin sesgo para evaluar la dispersión de la infección en diferentes áreas, incluso donde los recursos para la diagnosis clínica son limitados y cuando los sistemas de notificación no existen (Lodder y Husman 2020; Kitajima *et al.* 2020). El procedimiento de Epidemiología de Aguas Residuales va a ayudar a reducir los brotes de dispersión del virus, así como para la vigilancia de futuras epidemias (Mallapaty 2020; Mao *et al.* 2020). Esta metodología tiene la capacidad para detectar niveles bajos de virus especialmente en las primeras etapas de un brote o cuando los niveles de infección van decreciendo después de una intervención (Lodder y Husman 2020). El análisis del viroma de las aguas residuales permitirá detectar nuevos virus antes de su reconocimiento clínico en una comunidad, y la adopción de prevención temprana, así como la asignación de recursos a las áreas potencialmente afectadas (Daughton 2018; Bibby y Peccia 2013; Bibby *et al.* 2019; Fernandez-Casi *et al.* 2018). Las mayores limitaciones de este procedimiento epidemiológico para establecer predicciones cuantitativas a partir de los resultados de RNA viral son las sobre y subestimaciones de casos de infección, debido a la complejidad de las aguas residuales, la presencia muy reducida de biomarcadores en dichas aguas la incapacidad para señalar ubicaciones específicas (Ng *et al.* 2012; Mallapaty 2020; Ahmed *et al.* 2020b). En este contexto es esencial disponer de técnicas eficientes de muestreo de aguas residuales, métodos adecuados de medida de la concentración del virus, y pruebas robustas y sensibles de RTqPCR, todo ello asociado a un protocolo eficiente de transmisión de resultados analíticos y modelización de los mismos (Mallapaty 2020; Ahmed *et al.* 2020b). Usando esta técnica se ha comprobado una tasa elevada de detección, entre el 89 % y el 98 %, de Alfa, Beta, Gamma y Omicron. BA.1 y Omicron BA.2, con una tasa ligeramente inferior del 85 % para la variedad Delta ($p < 0{,}01$). Comprobándose que los resultados en aguas residuales se corresponden con las observaciones clínicas, por lo que los resultados en aguas residuales se podrían usar como indicador para predecir la carga de COVID-19 en la población (Hasing *et al.* 2023). No obstante, es necesario llevar a cabo una adecuada normalización y correlación de los resultados obtenidos en estudios de vigilancia (Jeon *et al.* 2023).

Recientemente, se ha propuesto el uso de biosensores para una vigilancia exhaustiva y rápida de la presencia del COVID-19 en el aire, ambientes interiores y

exteriores, aguas residuales, instalaciones hospitalarias y monitoreo medioambiental (Nadziraha *et al.* 2023).

RETOS Y RECOMENDACIONES

Desde tiempos remotos, las enfermedades causadas por virus han representado un serio problema sanitario, así como económico, a escalas epidémicas o pandémicas. Los CoVs han producido brotes en tres casos generalizados, como los producidos por SARS-CoV-2 (2019), MERS-CoV (2012), and SARS-CoV-1 (2003) en las dos últimas décadas. Los coronavirus pertenecen a la familia de los virus con cubierta de linaje βCoV con + ARN monocatenario con espículas en forma de corona en su superficie. La secuencia genética del SARS-CoV-2 tiene más del 80 % en común con el SARS-CoV-1. La proteína de las espículas se une a la célula huésped mediante el receptor ACE2 y se replica en los pulmones corazón, intestinos, vasos sanguíneos y músculos. Diversos estudios demuestran la replicación y persistencia de los CoV (incluido el SARS-CoV-2) en el tracto gastrointestinal y su eliminación por las heces, lo que abre la puerta a la transmisión del virus por la ruta fecal-oral a través de las matrices medioambientales a pacientes, individuos presintomáticos y asintomáticos, que también contribuyen a la dispersión del virus.

El estudio de las heces muestra la presencia de RNA viral y viriones infecciosos. Los virus entéricos persisten en las heces durante varios días manteniendo su infectividad. La presencia de SARS-CoV-2 en los sistemas agua/aguas residuales/lodos residuales se mantiene también durante varios días, sobre todo en la fase acuosa. Sin embargo, la transmisión del SARS-CoV-2 por la ruta fecal-oral no está todavía completamente establecida, a pesar de la evidencia de que el SARS-CoV-1 se dispersa por aerosoles. La presencia de una dosis infecciosa del SARS-CoV-2 y la duración de su persistencia en heces/aguas residuales son aspectos significativos que es necesario estudiar con detalle, utilizando un número grande de muestras que permita abordar con seguridad este problema. Es necesario llevar a cabo estudios regulares de los virus en la entrada de los EDARs junto con otros parámetros, para lograr de manera segura y anticipada la aparición de un brote. En este contexto, los especialistas señalan la necesidad desarrollar una Epidemiología de Aguas Residuales para la vigilancia de la posible circulación del virus por la comunidad. Sin embargo, es necesario desarrollar métodos de detección rápidos, eficientes y simples para las muestras medioambientales y aplicarlas dentro de un marco regulatorio adecuado.

La detección, cuantificación y determinación de la virulencia en muestras medioambientales constituye un gran desafío para los científicos de este campo. La detección de los virus entéricos en matrices medioambientales es un importante prerrequisito para conocer el destino y virulencia del patógeno, así como para diseñar una estrategia adecuada de inactivación/tratamiento. El protocolo de detección del virus en matrices medioambientales deberá considerar la toma de muestra su transporte almacenamiento, preconcentración, detección e inactivación, incluyendo todas las medidas de seguridad de cada una de estas etapas con nivel de bioseguridad (NBS) 2 o superior. La detección de virus entéricos en muestras medioambientales es muy compleja debido a su concentración relativamente baja en el agua/agua residual, la interferencia asociada a la presencia de materia en las aguas residuales y la selectividad de los métodos para una cuantificación precisa. Conocer la concentración de los virus con envoltura en grandes volúmenes de muestras medioambientales es un pre-requisito importante antes de su detección. Generalmente, es necesario llevar a cabo una etapa de preconcentración, con filtro de partículas electropositivos, precipitación con polietilenglicol (PEG) y floculación, ulrafiltración/ultracentrifugación, con objeto de poder estudiar volúmenes pequeños de muestra. Para la detección del virus en los extractos resultantes de la preconcentración se aplican técnicas moleculares como RT-PCR, qPCR, dPCR, PCR anidada, NGS y MALDI-TOF, sensibles y específicas que permiten una información cuantitativa sobre el genoma viral, utilizando, generalmente, procesos de control internos y externos para asegurar la exactitud de la detección. Ya que los virus tienen un riesgo potencial para la salud, su inactivación en el agua o agua residual constituye una prioridad esencial. No obstante, no existen todavía informes específicos sobre inactivación de SARS-CoV-2 en aguas residuales. En gran parte debido a que es necesario conocer bien la naturaleza y comportamiento de los CoV para diseñar una estrategia eficaz de inactivación. Un virus con envoltura como los CoV son más inestable a los oxidantes y resisten mejor las condiciones medioambientales que los virus sin envoltura. Las unidades primarias y secundarias de operación de las EDARs solo eliminan virus de forma reducida, para inactivar los virus, así como otros patógenos son necesarios métodos de desinfección como la cloración, ozonación, H_2O_2, NaOCl y ácido peracético bajo irradiación con luz solar y UV, que se integran en las unidades de inactivación de los virus de los EDARs. En general, los radicales reactivos que se producen en estos procesos dañan a la envoltura y/o la cápside y/o el ARN vírico. Sin embargo, la dosificación del agente desinfectante y la radiación, el tiempo de contacto, pH y carbono en la fase acuosa, la presencia de depredadores, y otros factores, tienen un papel regulador sobre la eficiencia de la inactivación. La unión del virus a biofilms o lodos, así como su interacción con microorganismos, plantas y animales

es también un factor a tener en cuenta. La persistencia de virus con envoltura y sin ella se conoce después de aplicar estos procesos de desinfección sobre el agua residual y el agua ya tratada, lo que justifica la necesidad de estrategias avanzadas como los procesos de oxidación avanzados o tratamientos integrados que aseguren descargas libres de virus. La optimización de estrategias integradas con procesos de desinfección convencionales, la comprensión de los mecanismos de la inactivación viral, la vigilancia de las descargas víricas, el papel de los bacteriófagos etc., son aspectos críticos que deben ser investigados para el SARS-CoV-2 de manera específica en las diversas instalaciones medioambientales de manera que será necesario rediseñar los EDARs considerando el presente y el futuro de la situación pandémica, integrando procedimientos multi-barrera con dos o más estrategias de desinfección orientadas a dañar la actividad funcional del genoma y de la envoltura, de manera que se disponga de una inactivación eficiente de los patógenos virales.

Por otro lado, es necesario adecuar la infraestructura de las plantas de tratamiento de aguas y aguas residuales para evitar el posible riesgo de transmisión a los operarios, adoptando para ello las necesarias medidas de protección frente a la infección viral, con equipos de protección personal que incluya ropas protectoras, guantes, botas, gafas protectoras, mascarillas FFP3, caretas que cubran ojo, nariz y boca, la limpieza regular de las áreas de trabajo, lavado frecuente de manos, reuniones de forma virtual, etc. Es necesario crear una adecuada mentalidad de protección mediante folletos y redes sociales, sugiriendo las medidas necesarias de seguridad frente al virus y sus consecuencias.

BIBLIOGRAFÍA

ABOUBAKR, H.A., SHARAFELDIN, T.A. & GOYAL, S.M. (2020), Stability of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses in the Environment and on Common Touch Surfaces and the Influence of Climatic Conditions: A Review. Transboundary and Emerging Diseases 68(2): 296-312.

ACHAK, M., BAKRI, S.A., CHHITI, Y., M'HAMDI ALAOUI, F.E., BARKA, N. & BOUMYA, W. (2021), SARS-CoV-2 in Hospital Wastewater during Outbreak of COVID-19: A Review on Detection, Survival and Disinfection Technologies. The Science of Total Environment 761: 143192.

AGULLO-BARCELO, M., POLO-LOPEZ, M.I., LUCENA, F., JOFRE, J., FERNANDEZ-IBANEZ, P. & SOLAR, P. (2013), Advanced Oxidation Processes as Disinfection Tertiary Treatments for Real Wastewater: Implications for Water Reclamation. Applied Catalysis B: Environmental 136-137: 341-350.

AHMED, W., ANGEL, N., EDSON, J., ..., HUGENHOLTZ, Ph., THOMAS, K.V. & MUELLER, J.F. (2020a), First Confirmed Detection of SARS-CoV-2 in Untreated Wastewater in Australia: A Proof of Concept for the Wastewater Surveillance of COVID-19 in the Community. The Science of Total Environment 728: 138764.

AHMED, W., BERTSCH, P.M., BIVINS, A., ..., THOMAS, K.V., VERHAGEN, R. & KITAJIMA, M. (2020b), Comparison of Virus Concentration Methods for the RT-qPCR-Based Recovery of Murine Hepatitis Virus, a Surrogate for SARS-CoV-2 from Untreated Wastewater, The Science of Total Environment 739: 139960.

ALEXYUK, M.S., TURMAGAMBETOVA, A.S. & ALEXYUK, P.G. (2017), Comparative Study of Viromes from Freshwater Samples of the Ile-Balkhash Region of Kazakhstan Captured through Metagenomic Analysis. Virus Diseases 28: 18-25.

ALIDADI, M. & SHARIFI, A. (2022), Effects of the Built Environment and Human Factors on the Spread of COVID-19: A Systematic Literature Review. The Science of Total Environment 850: 158056.

AMIRIAN, E.S. (2020), Potential Fecal Transmission of SARS-CoV-2: Current Evidence and Implications for Public Health, International Journal of Infectious Diseases 95: 363-370.

AMPUERO, M., VALENZUELA, S., VALIENTE-ECHEVERRIA, F., SOTO-RIFO, R., BARRIGA, G.P. & CHNAIDERMAN, J. (2020), SARS-CoV-2 Detection in Sewage in Santiago, Chile-Preliminary Results. medRxiv. https://doi.org/10.1101/2020.07.02.20145177

ANGELESCU, D.G. & LINSE, P. (2008), Viruses as Supramolecular Self-Assemblies: Modelling of Capsid Formation and Genome Packaging, Soft Matter 4 (10): 1981-1990.

ARORA, S., NAG, A., SETHI, J., RAJVANSHI, J., SAXENA, S., SHRIVASTAVA, S.K. & GUOTA, A.B. (2020), Sewage surveillance for the Presence of SARS-CoV-2 Genome as a Useful Wastewater Based Epidemiology (WBE) Tracking Tool in India. Water Science and Technology 82(12): 2823-2836.

ARSLAN, M., XU, B. & EL-DIN, M.G. (2020), Transmission of SARS-CoV-2 via Fecal-Oral and Aerosols – Borne Routes: Environmental Dynamics and Implications for Wastewater Management in Underprivileged Societies. The Science of Total Environment 743: 140709.

AVINO, P., SCUNGIO, M., STABILE, L., CORTELLESSA, G., BUONANNO, G. & MANIGRASSO, M. (2018), Second-Hand Aerosol from Tobacco and Electronic Cigarettes: Evaluation of the Smoker Emission Rates and Doses and Lung Cancer Risk of Passive Smokers and Vapers. The Science of Total Environment 642: 137-147.

BACNIK, K., KUTNJAK, D., PECMAN, A., ..., ZNIDARIC, M.T., AGUIRRE, I.G. & RAVNIKAR, M. (2020), Viromics and Infectivity Analysis Reveal the Release of Infective Plant Viruses from Wastewater into the Environment. Water Research 177: 115628.

BALBOA, S., MAURICIO-IGLESIAS, M., RODRÍGUEZ, S., ..., VASALLO, F.J., REGUEIRO, B. & LEMA, J.M. (2020), The Fate of SARS-CoV-2 in Wastewater Treatment Plants Points Out the Sludge Line as a Suitable Spot for Incidence Monitoring. The Science of Total Environment 772: 145268.

BELOSI, F., CONTE, M., GIANELLE, V., SANTACHIARA, G. & CONTINI, D. (2021), On the Concentration of SARS-CoV-2 in Outdoor Air and the Interaction with Pre-Existing Atmospheric Particles. Environmental Research 193: 110603.

BIBBY, E., VIAU, E.J. & PECCIA, J. (2011), Viral Metagenome Analysis to Guide Human Pathogen Monitoring in Environmental Samples. Letters Applied Microbiology 52(4): 386-392.

BIBBY, K. & PECCIA, J. (2013), Identification of Viral Pathogen Diversity in Sewage Sludge by Metagenome Analysis. Environmental Science and Technology 47 (4): 1945-1951.

BIBBY, K., CARVALHO, N.A. & WIGGINTON, K. (2017), Research Needs for Wastewater Handling in Virus Outbreak Response. Environmental Science and Technology 51(5): 2534-2535.

BIBBY, K. CRANK, K., GREAVES, J., LI, X., WU, Z., HAMZA I.A & STACHLER, E. (2019), Metagenomics and the Development of Viral Water Quality Tools, npj Clean Water 2 (1): 1-13.

BIVINS, A., NORTH, D., AHMAD, A., ..., WIGGINTON, K., ZHU, K. & KYLE BIBBY, K. (2020), Wastewater Based Epidemiology: Global Collaborative to Maximize Contributions in the Fight against COVID-19. Environmental Science and Technology 54: 7754-7757.

BLANCO, A., ABID, I., AL-OTAIBI, N., PEREZ-RODRIGUEZ, F.J., FUENTES, GUIX, C.S., PINTO, R.M. & BOSCH, A. (2019), Glass Wool Concentration Optimization for the Detection of Enveloped and Non-Enveloped Waterborne Viruses. Food and Environmental Virology 11 (2): 184-192.

BOFILL-MAS, S. & RUSIÑOL, M. (2020), Recent Trends on Methods for the Concentration of Viruses from Water Samples. Current Opinion in Environmental Science & Health 16: 7-13.

BOSCH, A., PINTÓ, R.M. & ABAD, F.X. (2006), Survival and Transport of Enteric Viruses in the Environment. Viruses in Foods: 151-187.

BRUGNERA M.F., DE ARAÚJO SOUZA, B.C. & ZANONI, M.V.B. (2016), Advanced Oxidation Process Applied to Actinobacterium Disinfection. Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications, 353.

CAI, J., XU, J., LIN D., YANG Z., ..., LI, J., WANG, J. & ZENG, M. (2020a), A Case Series of Children with 2019 Novel Coronavirus Infection: Clinical and Epidemiological Features. Clinical Infectious Diseases 71 (6): 1547-1551.

CAI, J., SUN, W., HUANG, J., GAMBER, M., WU, J. & HE, G. (2020b), Indirect Virus Transmission in Cluster of COVID-19 Cases, Wenzhou, China, 2020. Emerging Infectious Diseases 26: 1343-1345.

CAHILL, N. & MORRIS, D. (2020), Recreational Waters – A Potential Transmission Route for SARSCoV-2 to Humans? The Science of Total Environment 740: 140122.

CARROLL, D., DASZAK, P., WOLFE, N.D., ..., PABLOS-MENDEZ, A., TOMORI, O. & MAZET, J.A.K. (2018), The Global Virome Project. Science 359 (6378): 872-874.

CASANOVA, L., RUTALA, W.A., WEBER, D.J. & M.D. SOBSEY, M.D. (2009), Survival of Surrogate Corona Viruses in Water. Water Research 43 (7): 1893-1898.

CHAN, J.F.-W., YIP, C.C.-Y., TO, K.K.-W., ..., CHAN, H.-H., TSANG, O.T.-Y & YUEN, K.-Y. (2020a), Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology 58: e488-e496.

CHAN, J.F.W., YUAN, S., KOK, K.H., ..., YIP, C.C.Y., POON, R.W.S. & TSOI, H.W. (2020b), A Familial Cluster of Pneumonia Associated with the 2019 Novel Coronavirus Indicating Person-to-Person Transmission: A Study of a Family Cluster. The Lancet 395: 514-523.

CHAN, J.F.-W., YIP, C.C.-Y., TO, K.K.-W., ..., CHAN, K.-H., TSANG, O.T.-Y. & YUEN, K.-Y. (2020c), Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. Journal of Clinical Microbiology 58(5): e00310.

CHAUDHRY, R.M., NELSON, K.L. & DREWES, J.E. (2015), Mechanisms of Pathogenic Virus Removal in a Full-Scale Membrane Bioreactor. Environmental Science and Technology 49(5): 2815-2822.

CHAUHAN, V. (2020), Can Solar Energy Take Part in Fighting against COVID-19 Pandemic? A Review on Inactivation of SARS-CoV-2 in Water and Air Using Solar Energy. EnerarXiv http://www.enerarxiv.org/page/thesis.html?id=1907, 1590192 057.

CHENG, R.H., KUHN, R.J., OLSON, N.H., ..., CHOI, H.K., SMITH, T.J. & BAKER. T.S. (1995), Nucleocapsid and

Glycoprotein Organization in an Enveloped Virus, Cell 80 (4): 621-630.

CHENG, P.K., WONG, D.A., TONG, L.K., ..., LAU, C.S., YEUNG, E.Y. & LIM, W.W. (2004), Viral Shedding Patterns of Coronavirus in Patients with Probable Severe Acute Respiratory Syndrome. The Lancet 363 (9422): 1699-1700.

CHEN, W., ZHANG, N., WEI, J.J., YEN H.L. & LI, Y. (2020), Short-Range Airborne Route Dominates Exposure of Respiratory Infection during Close Contact. Building and Environment 176: 106859.

CHEN, Z., ZHANG, W, YANG, H., ..., QU, G., LIU, Q. & JIANGAB, G. (2022), A Pandemic-Induced Environmental Dilemma of Disposable Masks: Solutions from the Perspective of the Life Cycle. Environmental Sciences: Processes Impacts 24: 649.

CHIN, A.W.H., CHU, J.T.S., PERERA, M.R.A., ..., CHAN, M.C.W., PEIRIS, M. & POON, L.L.M. (2020), Stability of SARS-CoV-2 in Different Environmental Conditions. The Lancet Microbe 1, e10.

COCCIA, M. (2020), Factors Determining the Diffusion of COVID-19 and Suggested Strategy to Prevent Future Accelerated Viral Infectivity Similar to COVID. The Science of Total Environment 729: 138474.

COLLIVIGNARELLI, M.C., ABBÀ, A., BENIGNA, I., SORLINI, S. & TORRETTA, V. (2018), Overview of the Main Disinfection Processes for Wastewater and Drinking Water Treatment Plants. Sustainability 10(1): 86.

COLLIVIGNARELLI, M.C., COLLIVIGNARELLI, C., MIINO, M.C., ABBÀ, A., PEDRAZZANI, R. & BERTANZA, G. (2020), SARS-CoV-2 in Wastewater Treatment Plants. medRxiv 143, 196-203. https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.06.049

COMUNIAN, S., DONGO, D., MILANI, CH. & PALESTINI, P. (2020), Air Pollution and COVID-19: The Role of Particulate Matter in the Spread and Increase of COVID-19's Morbidity and Mortality. International Journal of Environmental Research and Public Health 17: 4487.

CONTICINI, E., FREDIANI, B. & CARO, D. (2020), Can Atmospheric Pollution Be Considered a Cofactor in Extremely High Level of SARS-CoV-2 Lethality in Northern Italy? Environmental Pollution 261: 114465.

CORMAN, V.M., ALBARRAK, A.M., OMRANI, A.S., ..., MÜLLER, M.A., DROSTEN, C. & MEMISH, Z.A. (2016), Viral Shedding and Antibody Response in 37 Patients with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. Clinical Infectious Diseases 62: 477-483.

CORMAN, V.M., KALLIES, R., PHILIPPS, H., ..., BRUNINK, S., DROSTEN, C. & DREXLER, J.F. (2014), Characterization of a Novel Beta-Corona Virus Related to Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in European hedgehogs, Journal of Virology 88 (1): 717-724.

CRAWFORD, D. (2002), *The Invisible Enemy: A Natural History of Viruses*, OUP Oxford.

DAUGHTON, C.G. (2018), Monitoring Wastewater for Assessing Community Health: Sewage Chemical-Information Mining (SCIM). The Science of Total Environment 619-620: 748-764.

DAUGHTON, C.G. (2020a), Wastewater Surveillance for Population-Wide Covid-19: The Present and Future. The Science of Total Environment 736: 139631.

DAUGHTON, C.G. (2020b), The International Imperative to Rapidly and Inexpensively Monitor Community-Wide COVID-19 Infection Status and Trends. The Science of Total Environment 726: 138149.

DE GRAAF, M., BECK, R., CACCIO, S.M., ..., LE PENDU, J., DE WIT, E. & SCHULTSZ, C. (2017), Sustained Fecal-Oral Human-to-Human Transmission Following a Zoonotic Event. Current Opinion in Virology 22: 1-6.

DONOVAN, E., UNICE, K., ROBERTS, J.D., HARRIS, M. & FINLEY, B. (2008), Risk of Gastrointestinal Disease Associated with Exposure to Pathogens in the Water of the Lower Passaic River. Applied and Environmental Microbiology 74 (4): 994-1003.

DOREMALEN, N., BUSHMAKER, T., MORRIS, D.H., ..., LLOYD-SMITH, J.O., EMMIE WIT, E. & MUNSTER, V.J. (2020), Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. New England Journal of Medicine 382: 1564-1567.

EKANAYAKE, A., RAJAPAKSHA, A.U., HEWAWASAM, CH., ..., KURWADKAR, S., BISWAS, J.K. & VITHANAGE, M. 2023, Environmental Challenges of COVID-19 Pandemic: Resilience and Sustainability – A Review. Environmental Research 216: 114496.

EL-SAYYAD, GH.S., ELFADIL, D., GABALLAH, M.S., ..., NADA, H.G., KHALIL, M.S. & GHORAB, M.A. (2023), Implication of Nanotechnology to Reduce the Environmental Risks of Waste Associated with the COVID-19 Pandemic. RSC Advances 13: 12438.

FARKAS, K., HILLARY, L.S., MALHAM, S.K., MCDONALD, J.E. & JONES, D.L. (2020a), Wastewater and Public Health: The Potential of Wastewater Surveillance for Monitoring COVID-19. Current Opinion in Environmental Science and Health 17: 14-20.

FARKAS, K., MANNION, F., HILLARY, L.S., MALHAM, S.K. & WALKER, D.I. (2020b), Emerging Technologies for the Rapid Detection of Enteric Viruses in the Aquatic Environment. Current Opinion in Environmental Science and Health 16: 1-6.

FEARS, A.C., KLIMSTRA, W.B., DUPREX, P., ..., GARRY, R.F., REED, D.S. & C.J. ROY, C.J. (2020), Comparative

Dynamic Aerosol Efficiencies of Three Emergent Coronaviruses and the Unusual Persistence of SARS-CoV-2 in Aerosol Suspensions. medRxiv https://doi.org/10.1101/2020.04.13.20063784

FERNANDEZ-CASSI, X., TIMONEDA, N., MARTINEZ-PUCHOL, S., ..., BOFILL-MAS, S., ABRIL, J.F. & GIRONES, R. (2018), Metagenomics for the Study of Viruses in Urban Sewage as a Tool for Public Health Surveillance. The Science of Total Environment 618: 870-880.

FERNSTROM, A. & GOLDBLATT, M. (2013), Aerobiology and Its Role In the Transmission of Infectious Diseases. Journal of Pathogens 2013: 493960.

FOLADORI, P., CUTRUPI, F., SEGATA, N, ..., MALPEI, F., LAURA BRUNI, L. & LA ROSA, G. (2020), SARS-CoV-2 from Faeces to Wastewater Treatment: What Do We Know? A Review. The Science of Total Environment 743: 140444.

GALE M., TAN, S.L. & M.G. KATZE, M.G. (2000), Translational Control of Viral Gene Expression in Eukaryotes, Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 (2): 239-280.

GE, X.Y., LI, J.L., YANG, X.L., CHMURA, A.A., ..., ZHANG, W., PENG, C. & ZHANG, Y.J. (2013), Isolation and Characterization of a Bat SARS-Like Coronavirus that Uses the ACE2 Receptor. Nature 503 (7477): 535-538.

GEOGHEGAN, J.L., SENIOR, A.M., DI GIALLONARDO, F. & HOLMES, E.C. (2016), Virological Factors that Increase the Transmissibility of Emerging Human Viruses. Proceedings of the National Academy of Sciences 113 (15): 4170-4175.

GERBA, C.P. (2007), Virus Occurrence and Survival in the Environmental Waters, Perspectives in Medical Virology 17: 91-108.

GERBA, C.P. (2009), Environmentally Transmitted Pathogens. Environmental Microbiology: 445-484.

GEYER, R., JAMBECK, J.R. & LAW, K.L. (2017), Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. Science Advances 3: e1700782.

GIANNAKIS, S., ANDROULAKI, B., COMNINELLIS, C. & PULGARIN, C. (2018), Wastewater and Urine Treatment by UVC-Based Advanced Oxidation Processes: Implications from the Interactions of Bacteria, Viruses, and Chemical Contaminants. Chemical Engineering Journal 343: 270-282.

GOMES, J., MATOS, A., GMUREK, M., QUINTA-FERREIRA, R.M. & MARTINS, R.C. (2019), Ozone and Photocatalytic Processes for Pathogens Removal from Water: A Review. Catalysts 9 (1): 46.

GOLDMAN, E. (2020), Exaggerated Risk of Transmission of COVID-19 by Fomites. Lancet Infectious Diseases 20: 892-893.

GORMLEY, M., SWAFFIELD, J., SLEIGH, P. & NOAKES, C. (2012), An Assessment of, and Response to, Potential Cross-Contamination Routes Due to Defective Appliance Water Trap Seals in Building Drainage Systems. Building Services Engineering Research and Technology 33 (2): 203-222.

GORMLEY, M., TEMPLETON, K., KELLY, D. & HARDIE, A. (2014), Environmental Conditions and the Prevalence of Norovirus in Hospital Building Drainage System Wastewater and Airflows, Building Services Engineering Research and Technology 35 (3): 244-253.

GORMLEY, M., ASPRAY, T.J. & KELLY, D.A. (2020), COVID-19: Mitigating Transmission via Wastewater Plumbing Systems. Lancet Global Health 8: E643.

GRAIVER, D.A., TOPLIFF, C.L., KELLING, C.L. & BARTELT-HUNT, S.L. (2009), Survival of the Avian Influenza Virus (H6N2) after Land Disposal, Environmental Science and Technology 43 (11): 4063-4067.

GREEN, H., WILDER, M., MIDDLETON, F.A., ..., ZENG, T., MIDDLETON, F.A. & LARSEN, D.A. (2020), Quantification of SARS-CoV-2 and Cross-Assembly Phage (crAssphage) from Wastewater to Monitor Coronavirus Transmission within Communities. medRxiv https://doi.org/10.1101/2020.05.21.20109181

GU, J., HAN, B. & WANG, J. (2020), COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal-Oral Transmission. Gastroenterology 158 (6): 1518-1519.

GUNDY, P.M., GERBA, C.P. & PEPPER, I.L. (2009), Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater. Food Environmental Virology 1 (1): 10.

GUPTA, S., PARKER, J., SMITS, S., UNDERWOOD, J. & DOLWANI, S. (2020), Persistent Viral Shedding of SARS-CoV-2 in Faeces – A Rapid Review. Colorectal Disease 22: 611-620.

HALE, R.C. & SONG, B. (2020), Single-Use Plastics and COVID-19: Scientific Evidence and Environmental Regulations. Environmental Science and Technology 54: 7034-7036.

HAMMAD, H.M., NAUMAN, H.M.F., ABBAS, F., ..., MUBEEN, M., FAHAD, S. & CERDA, A. (2023), Impacts of COVID-19 Pandemic on Environment, Society, and Food Security. Environmental Science and Pollution Research 30: 99261-99272.

HARAMOTO, E., KITAJIMA, M., HATA, A., ..., MASAGO, Y., SANO, D. & KATAYAMA, H. (2018), A Review on Recent Progress in the Detection Methods and Prevalence of Human Enteric Viruses in Water. Water Research 135: 168-186.

HARAMOTO, E., MALLA, B., THAKALI, O. & KITAJIMA, M. (2020), First Environmental Surveillance for the Presence of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater and River Water in Japan. The Science of Total Environment 737: 140405.

HART, O.E. & HALDEN, R.U. (2020), Computational Analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 Surveillance by Wastewater-Based Epidemiology Locally and Globally: Feasibility, Economy, Opportunities and Challenges. The Science of Total Environment 730, 138875.

HASAN, M., TOWFIQUL ISLAM, A.R.M, FARJANA JION, M.M.M., ..., RAKIB, MD.R.J., IDRIS, A.M. & MALAFAIA, G. (2023), Personal Protective Equipment-Derived Pollution during COVID-19 Era: A Critical Review of Ecotoxicology Impacts, Intervention Strategies, and Future Challenges. The Science of Total Environment 887: 164164.

HASING, M.E., LEE, B.E., GAO, T., ..., FRANKOWSKI, K., HRUDEY, S.E., XIAOLI L. & PANG, X.L. (2023), Wastewater Surveillance Monitoring of SARS-CoV-2 Variants of Concern and Dynamics of Transmission and Community Burden of COVID-19. Emerging Microbes & Infections. 12: 2233638.

HATA, K. & HONDA, R. (2020), Potential Sensitivity of Wastewater Monitoring for SARS-CoV-2: Comparison with Norovirus Cases. Environmental Science and Technology 54: 6451-6452.

HELLER, L., MOTA, C.R. & GRECO, D.B. (2020), COVID-19 Faecal-Oral Transmission: Are We Asking the Right Questions? The Science of Total Environment 729: 138919.

HELLEWELL, J., ABBOTT, S., GIMMA, A., ..., EDMUNDS, W.J., SUN, F. & FLASCHE, S. (2020), Feasibility of Controlling COVID-19 Outbreaks by Isolation of Cases and Contacts. Lancet Global Health 8(4): e488-e496.

HEMALATHA, M., KIRAN, U., KUNCHA, S.K., KOPPERI, H., GOKULAN, C.G., MOHAN, S.V. & MISHRA, R.K. (2021), Comprehensive Surveillance of SARS-CoV-2 Spread Using Wastewater-Based Epidemiology Studies. The Science of Total Environment 768: 144704.

HINDSON, J. (2020), COVID-19: Faecal-Oral Transmission? Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 17: 259.

HIEP, N.T., NGUYEN, M.-K., NHUT, H.T., ..., CHANG, S.W., UM, M.J. & NGUYEN, D.D. (2023), A Review on Sterilization Methods of Environmental Decontamination to Prevent the Coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19 Virus): A New Challenge towards Eco-Friendly Solutions. The Science of Total Environment 904: 166021.

HOLSHUE, M.L., DEBOLT, C., LINDQUIST, S., ..., BIGGS, H.M., UYEKI, T.M. & PILLAI, S.K. (2020), First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. New England Journal of Medicine 382, 929-936.

HORNSTRA, L.M., DA SILVA, T.R., BLANKERT, B., ..., BEERENDONK, E., CORNELISSEN, E.R. & MEDEMA, G. (2019), Monitoring the Integrity of Reverse Osmosis Membranes Using Novel Indigenous Freshwater Viruses and Bacteriophages, Environmental Science: Water Research and Technology 5 (9): 1535-1544.

HUANG, R., MA, CH., HUANGFU, X. & MA, J. (2023), Preparing for the Next Pandemic: Predicting UV Inactivation of Coronaviruses with Machine Learning. Environmental Science and Technology 2023, 57, 13767-13777.

HUNG, I.F.N., CHENG, V.C.C., WU, A.K.L., ..., LAU, S.K.P., PEIRIS, J.S.M. & YUEN, K.Y. (2004), Viral Loads in Clinical Specimens and SARS Manifestations. Emerging Infectious Diseases 10, 1550.

ISHII, S., KITAMURA, G., SEGAWA, T., KOBAYASHI, A., MIURA, T., SANO, D. & OKABEA, S. (2014), Microfluidic Quantitative PCR for Simultaneous Quantification of Multiple Viruses in Environmental Water Samples. Applied and Environmental Microbiology 80: 7505-7511.

JAKARIYA, M., AHMED, F., ISLAM, M., ..., BARCELO, D., BIBBY, K. & BHATTACHARYA, P. (2022), Wastewater-Based Epidemiological Surveillance to Monitor the Prevalence of SARS-CoV-2 in Developing Countries with Onsite Sanitation Facilities. Environmental Pollution 311: 119679.

JALANDRA, R., YADAV, A.K., VERMA, D., ..., SINGH, R., KUMAR, A. & SOLANKI, P.R. (2020a), Strategic and Perspectives to Develop SARS-CoV-2 Detection Methods and Diagnostics. Biomedicine and Pharmacotherapy 129: 110446.

JALANDRA, R., YADAV, A.K., VERMA, D., ..., SINGH, R., KUMAR, A., SOLANKI, P.R. (2020b), Strategic and Perspectives to Develop SARS-CoV-2 Detection Methods and Diagnostics. Biomedicine and Pharmacotherapy 129: 110446.

JEON, M.K., LI, B., DI, D.Y.W. & YAN, T. (2023), Prewhitening and Normalization Help Detect a Strong Cross-Correlation between Daily Wastewater SARS-CoV-2 RNA Abundance and COVID-19 Cases in a Community. Environmental Science: Water Research Technology 9: 1403.

JIANG, Y., FANG, L., SHI, X., ..., CHEN, Q., LI, H. & ZHOU, L. (2014), Simultaneous Detection of Five Enteric Viruses Associated with Gastroenteritis by Use of a PCR Assay: A Single Realtime Multiplex Reaction and Its Clinical Application. Journal of Clinical Microbiology 52: 1266-1268.

JONES, K.E., PATEL, N.G., LEVY, M.A., ..., BALK, D. GITTLEMAN, J.L. & DASZAK, P. (2008), Global Trends in Emerging Infectious Diseases. Nature 451 (7181): 990-993.

KAMPF, G., TODT, D., PFAENDER, S. & STEINMANN, E. (2020a), Persistence of Coronaviruses on Inanimate

Surfaces and Their Inactivation with Biocidal Agents. Journal of Hospital Infection 104: 246-251.

KAMP, G. (2020a), Potential Role of Inanimate Surfaces for the Spread of Coronaviruses and Their Inactivation with Disinfectant Agents. Infection Prevention in Practice 2: 100044.

KAMP, G., VOSS, A. & SCHEITHAUER, S. (2020b), Inactivation of Coronaviruses by Heat. Journal of Hospital Infection 105: 348-349.

KASLOFF, S.B., LEUNG, A., STRONG, J.E., FUNK, D. & CUTTS, T.A. (2021), Stability of SARS-CoV-2 on Critical Personal Protective Equipment. Scientific Reports 11: 984.

KIM, H.K., YOON, S.W., KIM, D.J., ..., CHANG, K.T., SONG, D. & JEONG, D.G. (2016a), Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome-Like, Middle East Respiratory Syndrome-Like Bat Coronaviruses and Group H Rotavirus in Faeces of Korean Bats. Transboundary Emerging Diseases 63 (4): 365-372.

KIM, S.H., CHANG, S.Y., SUNG, M., ..., CHOI, J.P., CHOI, W.S. & MIN, J.Y. (2016b), Extensive Viable Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus Contamination in Air and Surrounding Environment in MERS Isolation Wards. Clinical Infectious Diseases 63 (3): 363-369.

KIM, V.D. KRISHNA, M., TORREMORELL, M., GOYAL, S.M. & CHEERAN, M.C.J. (2018), Stability of Porcine Epidemic Diarrhea Virus on Fomite Materials at Different Temperatures. Veterinary Science 5 (1): 21.

KING, S., KENNEDY, L.C., WOLFE, M.K., ..., WIGGINTON, K.R., BAKKERH, K.M. & BOEHM, A.B. (2022), SARS-CoV-2 RNA Is Enriched by Orders of Magnitude in Primary Settled Solids Relative to Liquid Wastewater at Publicly Owned Treatment Works. Environmental Science and Water Research Technology 8: 757.

KITAJIMA, W., AHMED, K., BIBBY, A., ..., HAMILTON, K. A., HARAMOTO, E. & ROSE, J.B. (2020), SARS-CoV-2 in Wastewater: State of the Knowledge and Research Needs. The Science of Total Environment 739: 139076.

KOCAMEMI, B.A., KURT, H., HACIOGLU, S., YARALI, C., SAATCI, A.M. & PAKDEMIRLI, B. (2020a), First Data-Set on SARS-CoV-2 Detection for Istanbul Wastewaters in Turkey. medRxiv https://doi.org/10.1101/2020.05.03.20089417

KOCAMEMI, B.A., KURT, H., SAIT, A., SARAC, F., SAATCI, A.M. & PAKDEMIRLI, B. (2020b), SARS-CoV-2 Detection in Istanbul Wastewater Treatment Plant Sludges. medRxiv https://doi.org/10.1101/2020.05.12.20099358

KUMAR, M., PATEL, A.K., SHAH, A.V., ..., RAJPARA, N., JOSHI, M. & JOSHI, CH.G. (2020), The First Proof of the Capability of Wastewater Surveillance for COVID-19 in India through the Detection of the Genetic Material of SARS-CoV-2. The Science of Total Environment 746: 141326.

LA ROSA, G., IACONELLI, M., MANCINI, P., ..., BONADONNA, L., LUCENTINI, L. & SUFFREDRINI E. (2020a), First Detection of SARS-CoV-2 in Untreated Wastewaters in Italy. The Science of Total Environment 736: 139652.

LA ROSA, G., BONADONNA, L., LUCENTINI, L., KENMOE, S. & SUFFREDINI, E. (2020b), Coronavirus in Water Environments: Occurrence, Persistence and Concentration Methods – A Scoping Review. Water Research 179: 115899.

LEE, P.I. & HSUEH, P.R. (2020), Emerging Threats from Zoonotic Coronaviruses – From SARS and MERS to 2019-nCoV. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 53(3): 365-367.

LESCURE, F.-X., BOUADMA, L., NGUYEN, D., ..., LINA, B., VAN-DER-WERF, S. & YAZDANPANAH, Y. (2020), Clinical and Virological Data of the First Cases of COVID-19 in Europe: A Case Series. The Lancet Infectious Diseases 20: 697-706.

LEUNG, W.K., TO, K.F., CHAN, P.K., ..., LEE, N., YUEN, K.Y. & SUNG, J.J. (2003), Enteric Involvement of Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus Infection. Gastroenterology 125 (4): 1011-1017.

LI, Y., ZHANG, C., SHUAI, D., NARAGINTI, S., WANG, D. & ZHANG, W. (2016), Visible-Light-Driven Photocatalytic Inactivation of MS2 by Metal-Free g-C3N4: Virucidal Performance and Mechanism. Water Research 106: 249-258.

LIBERTI, L., A. LOPEZ, A. & NOTARNICOLA, M. (1999), Disinfection with Peracetic Acid for Domestic Sewage Re-Use in Agriculture. Journal of Water Environmental Management 13: 262-269.

LIN, K. & MARR, L.C. (2017), Aerosolization of Ebola Virus Surrogates in Wastewater Systems. Environmental Science and Technology 51 (5): 2669-2675.

LIN, Y., WANG, J., YANG, W., TIAN, L. & CANDIDO, Ch. (2023), A Systematic Review on COVID-19 Related Research in HVAC System and Indoor Environment. Energy and Built Environment, in press.

LING, Y., XU, S.-B., LIN, Y.-X., TIAN, ..., LEI ZHU, L., ZHANG, W.-H. & LU, H.-Z. (2020), Persistence and Clearance of Viral RNA in 2019 Novel Coronavirus Disease Rehabilitation Patients. Chinese Medical Journal 133: 1039-1043.

LIU, J., LIAO, X., QIAN, S., ..., WANG, F.S., LIU, L. & ZHANG, Z. (2020), Community Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, Shenzhen, China, 2020. Emerging Infectious Diseases 26(6): 1320-1323.

LIU, G., MENG, Q., LI, Y., YILING LI, JIAO, T., ZHAO, H. & DAI, B. (2023), Bleeding Due to Successive Duodenal and Rectal Ulcers in an 81-Year-Old Patient with Severe COVID-19: A Case Report. BMC Geriatrics 23: 559-568.

LODDER, W.J., BUISMAN, A.M., RUTJES, S.A., HEIJNE, J.C., TEUNIS, P.F. & DE RODA HUSMAN, A.M. (2012), Feasibility of Quantitative Environmental Surveillance in Poliovirus Eradication Strategies. Applied and Environmental Microbiology 78 (11): 3800-3805.

LODDER, W.J., RUTJES, S.A., TAKUMI, K. & DE RODA HUSMAN, A.M. (2013), Aichi Virus in Sewage and Surface Water, The Netherlands. Emerging Infectious Diseases 19 (8): 1222.

LODDER, W. & HUSMAN, A.M.D.R. (2020), SARS-CoV-2 in Wastewater: Potential Health Risk, But Also Data Source. The Lancet Gastroenterology and Hepatology 5 (6): 533-534.

LUBELLO, C., CARETTI, R. & GORI, R. (2002), Comparison between PAA/UV and H2O2/UV Disinfection for Wastewater Reuse. Water Science and Technology: Water Supply 2 (1): 205-212.

MAHABEE-GITTENS, E.M., MERIANOS, A.L. & MATT, G.E. (2020), Letter to the Editor Regarding: «An Imperative Need for Research on the Role of Environmental Factors in Transmission of Novel Coronavirus (COVID-19)» – Secondhand and Thirdhand Smoke as Potential Sources of COVID-19. Environmental Science and Technology 54: 5309-5310.

MALLAPATY, S. (2020), How Sewage Could Reveal True Scale of Coronavirus Outbreak. Nature 580 (7802): 176-177.

MAO, K., ZHANG, H. & YANG, Z. (2020), Can a Paper-Based Device Trace COVID-19 Sources with Wastewater-Based Epidemiology? Environmental Science and Technology 54: 3733-3735.

MANCUSI, A., CAPUANO, F., GIRARDI, S., ..., LA ROSA, G., PROROGA, Y.T.R. & PIERRI, B. (2022), Detection of SARS-CoV-2 RNA in Bivalve Mollusks by DropletDigital RT-PCR (dd RT-PCR). International Journal of Environmental Research and Public Health 19: 943.

MANTILLA-CALDERON, D., HUANG, K., AOJIE LI, A., ..., YE, Y., LIUD, L. & FANGQIONG LING, F. (2012), Emerging Investigator Series: Meta-Analyses on SARS-CoV-2 Viral RNA Levels in Wastewater and Their Correlations to Epidemiological Indicators. Environmental Science: Water Research Technology 8: 1391.

MATTLE, M.J. & KOHN, T. (2012), Inactivation and Tailing during UV254 Disinfection of Viruses: Contributions of Viral Aggregation, Light Shielding within Viral Aggregates, and Recombination, Environmental Science and Technology 46 (18): 10022-10030.

McLELLAN, N., PERNITSKY, D. & UMBLE, A. (2020), Coronavirus and The Water Cycle – Here Is What Treatment Professionals Need to Know, Water Online (https://www.wateronline.com/doc/coronavirus-and-the-water-cycle-here-is-what-treatmentprofessionals-need-to-know-0001).

McMINN, B.R., ASHBOLT, N.J. & KORAJKIC, A. (2017), Bacteriophages as Indicators of Faecal Pollution and Enteric Virus Removal. Letters in Applied Microbiology 65 (1): 11-26.

MEDEMA, G., HEIJNEN, L., ELSINGA, G., ITALIAANDER, R. & BROUWER, A. (2020a), Presence of SARS Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in the Netherlands. Environmental Science and Technology Letters 7: 511-516.

MEDEMA, G., HEIJNEN, L., ELSINGA, G., ITALIAANDER, R. & A. BROUWER, A. (2020b). Presence of SARS Coronavirus-2 in Sewage, MedRxiv (2020).

MESELSON, M. (2020), Droplets and Aerosols in the Transmission of SARS-CoV-2. New England Journal of Medicine 382: 2063.

MEULEMANS, C.C.E. (1987), The Basic Principles of UV – Disinfection of Water. Ozone: Science and Engineering 9: 299-313.

MICHAEL-KORDATOU, I., KARAOLIA, P. & FATTA-KASSINOSA, D. (2020), Sewage Analysis as a Tool for the COVID-19 Pandemic Response and Management: The Urgent Need for Optimized Protocols for SARS-CoV-2 Detection and Quantification. Journal of Environmental Chemical Engineering 8: 104306.

MIZUMOTO, K., KAGAYA, K., ZAREBSKI, A. & CHOWELL, G. (2020), Estimating the Asymptomatic Proportion of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Cases on Board the Diamond Princess Cruise Ship, Yokohama. Eurosurveillance 25: 2000180.

NADDEO, V. & LIU, H. (2020), Editorial Perspectives: 2019 Novel Coronavirus (SARS-CoV-2): What Is Its Fate in Urban Water Cycle and How Can the Water Research Community Respond? Environmental Science: Water Research Technology 6: 1213-1216.

NALLA, A.K., CASTO, A.M., HUANG, M.-L.W., ..., ZHU, H., JEROME, K. & GRENINGER, A.L. (2020), Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit. Journal of Clinical Microbiology 58: e00557.

NAM, Y., LIM, J.H., KO, J.C. & LEE, J.Y. (2019), Photocatalytic Activity of TiO2 Nanoparticles: A Theoretical Aspect. Journal of Materials Chemistry A 7 (23): 13833-13859.

NADZIRAHA, SH., ZIN, N.M., KHALID, A., ..., ISMAIL, A.GH., DEE CH.F. &, HAMZAH, A.A. (2023),

Detection of SARS-CoV-2 in Environment: Current Surveillance and Effective Data Management of COVID-19. Critical Reviews in Analytical Chemistry; https://doi.org/10.1080/10408347.2023.2224433

NELSON, K.L., BOEHM, A.B., DAVIES-COLLEY, R.J., ..., MCNEILL, K., MITCH, W.A. & NGUYEN, T.H. (2018), Sunlight-Mediated Inactivation of Health-Relevant Microorganisms in Water: A Review of Mechanisms and Modeling Approaches. Environmental Science: Processes and Impacts 20 (8): 1089-1122.

NEMUDRYI, A., NEMUDRAIA, A., WIEGAND, T., ..., VANDERWOOD, K.K., WILKINSON, R. & WIEDENHEFT, B. (2020), Temporal Detection and Phylogenetic Assessment of SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater. Cell Reports Medicine 1: 100098.

NG, T.F.F., MARINE, R., WANG, C., ..., ODERINDE, B.S., WOMMACK, K.E. & DELWART, E. (2012), High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. Journal of Virology 86: 12161-12175.

NISHIURA, H., KOBAYASHI, T., MIYAMA, T., ..., YUAN, B., AKHMETZHANOV, A. & LINTON, N.M. (2020), Estimation of the Asymptomatic Ratio of Novel Coronavirus Infections (COVID-19). International Journal of Infectious Diseases 94: 154-155.

NÚÑEZ-DELGADO, A. (2020), What Do We Know about the SARS-CoV-2 Coronavirus in the Environment? The Science of Total Environment 727: 138647.

ODEH, I.I.N. & MARGERUM, D.W. (2006), Kinetics and Mechanisms of Chlorine Dioxide and Chlorite Oxidations of Cysteine and Glutathione. Inorganic Chemistry 45 (21): 8768-8775.

ONG, S.X., TAN, Y.K., CHIA, P.Y., LEE, T.H., NG, O.T., YEN WONG, S.Y. & MAROMUTHU, K. (2020), Air, Surface Environmental, and Personal Protective Equipment Contamination by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) from a symptomatic patient. JAMA 323, 1610-1612.

OR, I.B., YANIV, K., SHAGAN, M., ..., BITKOVER, Y. BERCHENKO, A. & KUSHMARO, A. (2022), Regressing SARS-CoV-2 Sewage Measurements onto COVID-19 Burden in the Population: A Proof-of Concept for Quantitative Environmental Surveillance. Frontiers in Public Health 9: 561710.

OOI, M.H., WONG, S.C., LEWTHWAITE, P., CARDOSA, M.J. & SOLOMON, T. (2010), Clinical Features, Diagnosis, and Management of Enterovirus 71. The Lancet Neurology 9 (11): 1097-1105.

OSUOLALE, O. &, OKOH, A. (2017), Human Enteric Bacteria and Viruses in Five Wastewater Treatment Plants in the Eastern Cape, South Africa, Journal of Infectious and Public Health 10 (5): 541-547.

PAN, Y., ZHANG, D., YANG, P., POON, L.L.M. & WANG, Q. (2020), Viral Load of SARS-CoV-2 in Clinical Samples. The Lancet Infectious Diseases 20: 411-412.

PARIDA, V.K., SAIDULU, D., BHATNAGAR, A., GUPTA, A.K. & AFZAL, M.S. (2023), A Critical Assessment of SARS-CoV-2 in Aqueous Environment: Existence, Detection, Survival, Wastewater-Based Surveillance, Inactivation Methods, and Effective Management of COVID-19. Chemosphere 327: 138503.

PASALARI, H., ATAEI-PIRKOOH, A., AMINIKHAH, M., JAFARI, A.J. & FARZADKIA, M. (2019), Assessment of Airborne Enteric Viruses Emitted from Wastewater Treatment Plant: Atmospheric Dispersion Model, Quantitative Microbial Risk Assessment, Disease Burden. Environmental Pollution 253: 464-473.

PATEL, M., KUMAR, R., KISHOR, K., MLSNA, T., PITTMAN JR., C.U. & MOHAN, D. (2019), Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. Chemical Reviews 119(6): 3510-3673.

PATEL, S.J., ZHAO, G., PENNA, V.R., ..., FREMONT, D.H., WANG, D. & YOKOYAMA, W.M. (2017), A Murine Herpesvirus Closely Related to Ubiquitous Human Herpesviruses Causes T-Cell Depletion. Journal of Virology 91: e02463-16.

PECI, A., WINTER, A.L., LI, Y., GNANESHAN, S., LIU, J., MUBAREKA, S. & GUBBAY, J.B. (2019), Effects of Absolute Humidity, Relative Humidity, Temperature, and Wind Speed on Influenza Activity in Toronto, Ontario, Canada. Applied Environmental Microbiology 85 (6): 02426-2518.

PECCIA, J., ZULLI, A., BRACKNEY, D.E., ..., WANG, M., WEINBERGE, D.M. & OMER, S.B. (2020), Measurement of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Tracks Community Infection Dynamics. Nature Biotechnology 38: 1164-1167.

PEIRIS, J.S.M., CHU, C.M., CHENG, V.C.C., ..., HON, T.Y.W., CHAN, C.S. & CHAN, K.H. (2003), Clinical Progression and Viral Load in a Community Outbreak of Coronavirus-Associated SARS Pneumonia: A Prospective Study. The Lancet 361 (9371): 1767-1772.

PETROVICH, M.L., MAAMAR, S.B., HARTMANN, E.M., MURPHY, B.T., PORETSKY, R.S. & WELLS, G.F. (2019), Viral Composition and Context in Metagenomes from Biofilm and Suspended Growth Municipal Wastewater Treatment Plants. Microbial Biotechnology 12 (6): 1324-1336.

PICA, N. & BOUVIER, N.M. (2012), Environmental Factors Affecting the Transmission of Respiratory Viruses, Current Opinion in Virology 2 (1): 90-95.

PINON, A. & VIALETTE, M. (2018), Survival of Viruses in Water. Intervirology 61 (5): 214-222.

POLO, I., GARCÍA-FERNÁNDEZ, P., FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, J.L., ..., MCNEILL, K., MITCH, W.A. & NGUYEN, T.H. (2018), Sunlight-Mediated Inactivation of Health-Relevant Microorganisms in Water: A Review of Mechanisms and Modeling Approaches. Environ Science: Processes and Impact 20 (8): 1089-1122.

POLO, D., LOISA, M., FERNÁNDEZ-NÚÑEZ, M.T. & ROMALDE, J.L. (2021), Detection of SARS-CoV-2 RNA in Bivalve Mollusks and Marine Sediments. The Science of the Total Environment 786: 147534.

PRUSSIN, A.J., SCHWAKE, D.O., LIN, K., GALLAGHER, D.L., BUTTLING, L. & MARR, L.C. (2018), Survival of the Enveloped Virus Phi6 in Droplets as a Function of Relative Humidity, Absolute Humidity, and Temperature. Applied and Environmental Microbiology 84 (12): 00551-618.

QIU, Y., LEE, B.E., NEUMANN, N., ASHBOLT, N., CRAIK, S., MAAL-BARED, R. & PANG, X.L. (2015), Assessment of Human Virus Removal during Municipal Wastewater Treatment in Edmonton, Canada. Journal of Applied Microbiology 119 (6): 1729-1739.

QIU, Y., LI, Q., LEE, B.E., RUECKER, N.J., NEUMANN, N.F., ASHBOLT, N.J. & PANG, X. (2018), UV Inactivation of Human Infectious Viruses at Two Full-Scale Wastewater Treatment Plants in Canada. Water Research 147: 73-81.

QU, G., LI, X., HU, L. & JIANG, G. (2020), An Imperative Need for Research on the Role of Environmental Factors in Transmission of Novel Coronavirus (COVID-19). Environmental Science and Technology 54(7): 3730-3732.

QUILLIAM, R.S., WEIDMANN, M., MORESCO, V., PURSHOUSE, H., O'HARA, Z. & OLIVER, D.M. (2020), COVID-19: The Environmental Implications of Shedding SARS-CoV-2 in Human Faeces. Environment International 140: 105790.

RANDAZZO, W., CUEVAS-FERRANDO, E., SANJUAN, R., DOMINGO-CALAP, P. & SANCHEZ, G. (2020a), Metropolitan Wastewater Analysis for COVID-19 Epidemiological Surveillance. International Journal of Hygiene and Environmental Health 230: 113621.

RANDAZZO, W., TRUCHADO, P., CUEVAS-FERRANDO, E., SIMÓN, P., ALLENDE, A. & SÁNCHEZ, G. (2020b), SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Anticipated COVID-19 Occurrence in a Low Prevalence Area. Water Research 181: 115942.

RUSIÑOL, M. & GIRONES, R. (2017), Summary of Excreted and Waterborne Viruses. In J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros (eds.), Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project) (J.S. Meschke, and R. Girones [eds.], Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiological Aspects – Section 1: Viruses), Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO.

RICE, W., ADCOCK, N.J., SIVAGANESAN, M., BROWN, J.D., STALLKNECHT, D.E. & SWAYNE, D.E. (2007), Chlorine Inactivation of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1), Emerging Infectious Diseases 13: 1568-1570.

RIMOLDI, S.G., STEFANI, F., GIGANTIELLO, A., ..., MOJA, L., GISMONDO, M.R. & SALERNO, F. (2020), Presence and Vitality of SARS-CoV-2 Virus in Wastewaters and Rivers. The Science of the Total Environment 744: 140911.

ROMANO-BERTRAND, S., GLELE, L.-S.A., GRANDBASTIEN, B. & LEPELLETIERE, D. (2020), Preventing SARS-CoV-2 Transmission in Rehabilitation Pools and Therapeutic Water Environments. Journal of Hospital Infection 105: 625-627.

RYCHLIK, K.A., SECREST, J.R., LAU, C., ..., RAJU, M., CHANG, R.C.A. & LI, Y. (2019), In Utero Ultrafine Particulate Matter Exposure Causes Offspring Pulmonary Immunosuppression. Proceeding of the National Academy of Sciences 116 (9): 3443-3448.

RZEŻUTKA, A. & COOK, N. (2004), Survival of Human Enteric Viruses in the Environment and Food. FEMS Microbiology Reviews 28 (4): 441-453.

SANTARPIA, J.L., RIVERA, D.N., HERRERA, V.L., ..., LAWLER, J.V., REID, A.P. & LOWE, J.J. (2020), Aerosol and Surface Contamination of SARS-CoV-2 Observed in Quarantine and Isolation Care. Scientific Reports 10: 1-8.

SCHELLER, C., KREBS, F., MINKNER, R., ASTNER, I., GIL-MOLES, M. & WÄTZIG, H. (2020), Physicochemical Properties of SARS-CoV-2 for Drug Targeting, Virus Inactivation and Attenuation, Vaccine Formulation and Quality Control. Electrophoresis 41(13-14): 1137-1151.

SCHIJVEN, J., VERMEULEN, L.C., SWART, A., MEIJER, A., DUIZER, E. & AND DE RODA HUSMAN, A.M. (2021), Quantitative Microbial Risk Assessment for Airborne Transmission of SARS-CoV-2 via Breathing, Speaking, Singing, Coughing, and Sneezing. Environmental Health Perspectives 129(4): 047002-2.

SEHMI, P. & CHERUIYOT, I. (2020), Presence of live SARS-CoV-2 Virus in Feces of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Patients: A Rapid Review. medRxiv https://doi.org/10.1101/2020.06.27.20105429

SETTI, L., PASSARINI, F., GENNARO, G.D., BARBIERI, P., ..., RUSCIO, M., PISCITELLI, P. & MIANI, A. (2020a), SARSCov-2 RNA Found on Particulate Matter of Bergamo in Northern Italy: First Evidence. Environmental Research 188: 109754.

SETTI, L., PASSARINI, F., DE GENNARO, G., BARBIERI, P., PALLAVICINI, A., RUSCIO, M., PISCITELLI, P., COLAO, A. & MIANI, A. (2020b), Searching for SARS-CoV-2 on Particulate Matter: A Possible Early Indicator of COVID-19 Epidemic Recurrence. International Journal of Environmental Research and Public Health 17: 2986.

SHUTLER, J., ZARASKA, K., HOLDING, T.M., MACHNIK, M., UPPULURI, K., ASHTON, I., MIGDAL, L. & DAHIYA, R. (2020), Risk of SARS-CoV-2 Infection from Contaminated Water Systems. medRxiv https://doi.org/10.1101/2020.06.17.20133504

SIDHU, J.P.S., SENA, K., HODGERS, L., PALMER, A. & TOZE, S. (2018), Comparative Enteric Viruses and Coliphage Removal during Wastewater Treatment Processes in a Sub-Tropical Environment. The Science of Total Environment 616: 669-677.

SIMS, N. & KASPRZYK-HORDERN, B. (2020), Future Perspectives of Wastewater-Based Epidemiology: Monitoring Infectious Disease Spread and Resistance to the Community Level. Environment International 139: 105689.

SUN, J., ZHU, A., LI, H., ..., HUANG, J., ZHAO, J. & LI, Y.-M. (2020), Isolation of Infectious SARS-CoV-2 from Urine of a COVID-19 Patient. Emerging Microbes Infectious 9: 991-993.

TANG, A., TONG, Z.-D., WANG, H.-L., ..., YU, M-L., LI, P., YAN, J.-B. (2020), Early Release Detection of Novel Coronavirus by RT-PCR in Stool Specimen from Asymptomatic Child, China. Emerging Infectious Diseases 26(6): 1337-1339.

TANG, J.W., MARR, L.C., LI, Y. & DANCE, S.J. (2021), COVID-19 Has Redefined Airborne Transmission. BMJ 373: n913.

TEYMOORIAN, T., TEYMOURIAN, T., KOWSARI, E. & RAMAKRISHNA, S. (2021), Direct and Indirect Effects of SARS-CoV-2 on Wastewater Treatment. Journal of Water Process Engineering 42: 102193.

THOMPSON, J.R., NANCHARAIAH, Y.V., GU, X., ..., NG, L.C., ALM, E.J. & WUERTZ, S. (2020), Making Waves: Wastewater Surveillance of SARS-CoV-2 for Population-Based Health Management, Water Research 184: 116181.

TONDERA, K., KLAER, K., GEBHARDT, J., ..., JURZIK, L., HAMZA, I.A. & PINNEKAMP, J. (2015), Reducing Pathogens in Combined Sewer Overflows Using Ozonation or UV Irradiation, International Journal of Hygiene and Environmental Health 218 (8): 731-741.

TORREY, J., GUNTEN, U. & KOHN, T. (2019), Differences in Viral Disinfection Mechanisms as Revealed by Quantitative Transfection of Echovirus 11 Genomes, Applied and Environmental Microbiology 85 (14): 00961-1019.

UPADHYAY, N., SUN, Q., ALLEN, J.O., WESTERHOFF, P. & HERCKES, P. (2013), Characterization of Aerosol Emissions from Wastewater Aeration Basins, Journal of Air Waster Management Association 63 (1): 20-26.

USEPA (US Environmental Protection Agency) (2003), Pesticide Fact Sheet, Boscalid, http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/boscalid.pdf

VADIATI, M., GHASEMI, L., SAMANI, S., ..., DHAMA, K., TIWARI, A. & BHATTACHARYA, P. (2023), A Sustainable Trend in COVID-19 Research: An Environmental Perspective. Frontiers in Environmental Science 11: 1104679.

VOGELS, C.B.F., BRITO, A.F., WYLLIE, A.L., ..., LANDRY, M.L., FOXMAN, E. & GRUBAUGH, N.D. (2020), Analytical Sensitivity and Efficiency Comparisons of SARS-CoV-2 qRT-PCR Assays. Nature Microbiology 5: 1299-1305.

WANG, X.W., LI, J.S., GUO, T.K. (2005a), Concentration and Detection of SARS Coronavirus in Sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital. Journal of Virological Methods 128 (91-20): 156-161.

WANG, X.W., LI, J.S., JIN, M., ..., WEI, W., WANG, G.J. & SI, B.Y. (2005b), Study on the Resistance of Severe Acute Respiratory Syndrome Associated Coronavirus, Journal of Virological Methods 126 (1-2): 171-177.

WANG, Q., VLASOVA, A.N., KENNEY, S.P. & SAIF, L.J. (2019), Emerging and Reemerging Coronaviruses in Pigs. Current Opinion in Virology 34: 39-49.

WANG, W., XU, Y., GAO, R., LU, R., HAN, K., WU, G. & TAN, W. (2020), Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA 323 (18): 1843-1844.

WANG, W., KANG, S., ZHOU, W. & VIKESLAND, P.J. (2023), Environmental Routes of Virus Transmission and the Application of Nanomaterial-Based Sensors for Virus Detection. Environmental Science: Nano 10: 393.

WEAVER, A., HEAD, J.R., GOULD, C.F., CARLTON, E.J. & REMAIS, J.V. (2022), Environmental Factors Influencing COVID-19. Incidence and Severity. Annual Review of Public Health. 43: 271-291.

WHO (2003), Consensus Document on the Epidemiology of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). World Health Organization, Geneva, p. 46.

WHO (2020), Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic. World Health Organization, Geneva https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019

WIGGINTON, K.R., PECSON, B.M., SIGSTAM, T., BOSSHARD, F. & KOHN, T. (2012), Virus Inactivation Mechanisms: Impact of Disinfectants on Virus Function and Structural Integrity. Environmental Science and Technology 46 (21): 12069-12078.

WIGGINTON, K.R., YE, Y. & ELLENBERG, R.M. (2015), Emerging Investigators Series: The Source and Fate of Pandemic Viruses in the Urban Water Cycle. Environmental Science and Water Research Technology 1(6): 735-746.

WIGGINTON, K.R. & BOEHM, A.B. (2020), Environmental Engineers and Scientists Have Important Roles to Play in Stemming Outbreaks and Pandemics Caused by Enveloped Viruses. Environmental Science and Technology 54: 3736-3739.

WISSKIRCHEN, K., LUCIFORA, J., MICHLER, T. & PROTZER, U. (2014), New Pharmacological Strategies to Fight Enveloped Viruses. Trends in Pharmacological Sciences 35 (9): 470-478.

WOLF, U., VON GUNTEN, U. & KOHN, T. (2018), Kinetics of Inactivation of Waterborne Enteric Viruses by Ozone. Environmental Science and Technology 52 (4): 2170-2177.

WÖLFEL, R., CORMAN, V.M., GUGGEMOS, W., ..., ZWIRGLMAIER, K., DROSTEN, C. & WENDTNER, C. (2020), Virological Assessment of Hospitalized Patients with COVID-2019. Nature 581: 465-469.

WONG, K., ONAN, B.M. & XAGORARAKI, I. (2010), Quantification of Enteric Viruses, Pathogen Indicators, and Salmonella Bacteria in Class B Anaerobically Digested Biosolids by Culture and Molecular Methods. Applied Environmental Microbiology 76 (19): 6441-6448.

WONG, A.C.P., LI, X., S.K.P. LAU, S.K.P. & WOO, P.C.Y. (2019), Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. Viruses 11: 174.

WORLDOMETER (2022), Worldometer – Real Time World Statistics.

WORKMAN, A.D., WELLING, D.B., CARTER, B.S., ..., GRAY, S.T., SCANGAS, G.A. & BLEIER, B.S. (2020), Endonasal Instrumentation and Aerosolization Risk in the Era of COVID-19: Simulation, Literature Review, and Proposed Mitigation Strategies. International Forum of Allergy & Rhinology 10(7): 798-805.

WU, G., BROWN, J., ZAMORA, M.L., ..., BURGHARDT, R.C., BAZER, F.W. & LI, Y. (2019), Adverse Organogenesis and Predisposed Long-Term Metabolic Syndrome from Prenatal Exposure to Fine Particulate Matter. Proceedings of the National Academy of Sciences 116 (24): 11590-11595.

WU, Y., GUO, C., TANG, L., ..., SHAN, H., JIANG, G. & HUANG, X. (2020a), Prolonged Presence of SARS-CoV-2 Viral RNA in Faecal Samples. The Lancet Gastroenterology and Hepatology 5: 434-435.

WU, F., ZHANG, J., XIAO, A., ..., CHAI, P.R., THOMPSON, J. & ALM, E.J. (2020b), SARS-CoV-2 Titers in Wastewater Are Higher than Expected from Clinically Confirmed Cases. mSystems 5: 10.1128/msystems.00614-20-

WURTZER, S., MARECHAL, V., MOUCHEL, J.-M. & MOULIN, L. (2020a), Time Course Quantitative Detection of SARS-CoV-2 in Parisian Wastewaters Correlates with COVID-19 Confirmed Cases. medRxiv https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679

WURTZER, S., MARECHAL, V., MOUCHEL, J.M., MADAY, Y., TEYSSOU, R., RICHARD, E., ALMAYRAC, J.L. & MOULIN, L. (2020b), Evaluation of Lockdown Effect on SARS-CoV-2 Dynamics through Viral Genome Quantification in Waste Water, Greater Paris, France, 5 March to 23 Abril 2020. Euro Surveillance 25(50): 2000776.

XAGORARAKI, I., YIN, Z. & SVAMBAYEV, Z. (2014), Fate of Viruses in Water Systems. Journal of Environmental Engineering 140 (7): 04014020.

XIAO, F., TANG, M., ZHENG, X., LIU, Y., LI, X. & SHAN, H. (2020), Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. Gastroenterology 158 (6): 1831-1833.

XU, P., JANEX, M.L., SAVOYE, P., COCKX, A. & LAZAROVA, V. (2002), Wastewater Disinfection by Ozone: Main Parameters for Process Design. Water Research 36 (4): 1043-1055.

XU, D., ZHANG, Z., JIN, L., ..., ZHANG, L., GAO, G.F. & WANG, F.S. (2005), Persistent Shedding of Viable SARS-CoV in Urine and Stool of SARS Patients during the Convalescent Phase. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 24 (3): 165-171.

XU, Y., LI, X., ZHU, B., ..., ZHAO, D., SHEN, J. & ZHANG, H. (2020), Characteristics of Pediatric SARS-CoV-2 Infection and Potential Evidence for Persistent Fecal Viral Shedding. Nature Medicine 26 (4): 502-505.

YE, Y., ELLENBERG, R.M., GRAHAM, K.E. & WIGGINTON, K.R. (2016), Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater. Environmental Science and Technology 50 (10): 5077-5085.

YE, Y., CHANG, P.H., HARTERT, J. & WIGGINTON, K.R. (2018), Reactivity of Enveloped Virus Genome, Proteins, and Lipids with Free Chlorine and UV254. Environmental Science and Technology 52: 7698-7708.

YEMMIREDDY, V.K. & HUNG, Y.C. (2017), Using Photocatalyst Metal Oxides as Antimicrobial Surface Coatings to Ensure Food Safety Opportunities and Challenges. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 16 (4): 617-631.

YEO, C., KAUSHAL, S. & YEO, D. (2020), Enteric Involvement of Coronaviruses: Is Faecal-Oral Transmission of SARS-CoV-2 Possible? The Lancet Gastroenterology and Hepatology 5(4): 335-337.

YU, I.T., Y. LI, Y., WONG, T.W., TAM, W., CHAN, A.T., LEE, J.H., LEUNG, D.Y. & HO, T. (2004), Evidence of Airborne Transmission of the Severe Acute

Respiratory Syndrome Virus. New England Journal of Medicine 350 (17): 1731-1739.

ZHANG, M., XU, L.M., XU; P.C. & WANG, X.C. (2016), Elimination of Viruses from Domestic Wastewater: Requirements and Technologies. World Journal of Microbiology and Biotechnology 32 (4): 69-78.

ZHANG, Y., LI, D., SHUAI, Y., SHEN, D. & WANG, X. (2019), Progress and Challenges in Photocatalytic Disinfection of Waterborne Viruses: A Review to Fill Current Knowledge Gaps. Chemical Engineering Journal 355: 399-415.

ZHANG, D., LING, H., HUANG, X., ..., LIU, Y., LI, G. & QU, J. (2020a), Potential Spreading Risks and Disinfection Challenges of Medical Wastewater by the Presence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Viral RNA in Septic Tanks of Fangcang Hospital. The Science of Total Environment 741: 140445.

ZHANG, Y., CHEN, C., ZHU, S., ..., WU, G., XU, J. & XU, W. (2020b), Isolation of 2019-nCoV from a Stool Specimen of a Laboratory-Confirmed Case of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). China CDC Weekly 2: 123-124.

ZHANG, H., KANG, Z., GONG, H., ..., MENG, T., ZHOU, W. & LIU, J. (2020c), The Digestive System Is a Potential Route of 2019-nCov Infection: A Bioinformatics Analysis Based on Single-Cell Transcriptomes, BioRxiv.

ZHENG, X., WANG, Q., CHEN, L., WANG, J. & CHENG, R. (2015), Photocatalytic Membrane Reactor (PMR) for Virus Removal in Water: Performance and Mechanisms. Chemical Engineering Journal 277: 124-129.

Capítulo XXI

Importancia de la patología oral en el desarrollo de la infección por SARS-CoV-2: criterios de causalidad y asociación

Guillermo Machuca Portillo
Académico numerario de la Academia de Ciencias Odontológicas de España
Catedrático del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla
Coordinador del Grado y Máster Oficial de Odontología en Pacientes con Necesidades Especiales

Clara Bueno Guerrero
Graduada en Odontología. Práctica privada en Sevilla

INTRODUCCIÓN

Como ya es bien sabido, la pandemia COVID-19 (enfermedad del Coronavirus 2019), está causada por un virus de tipo ARN perteneciente a la subfamilia de virus *Orthocoronavirinae*, concretamente llamado coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2). El SARS-CoV-2 cuenta su origen en la provincia china de Hubei, en la ciudad de Wuhan, donde por primera vez el mundo escuchó hablar del virus en diciembre de 2019. La propagación de dicho virus alcanzó gran velocidad, sometiendo al mundo a una pandemia a principios del año 2020. A 30 de agosto de 2022, España contaba con 13.342.530 casos confirmados, que han conducido a 112.600 fallecimientos. A nivel mundial se cuentan 603 millones de contagios, que han dado lugar a 6,49 millones de fallecimientos. Estos datos demuestran la alta transmisibilidad de este patógeno.

El período de incubación de la enfermedad tiene una duración media de 5,1 días. A los 11,7 días, casi el 95 % de los individuos asintomáticos habrían ya desarrollado sus síntomas. Los principales síntomas del COVID-19 que describe la Organización Mundial de la Salud (OMS) son tos seca, fiebre y cansancio, a los que se añaden otros menos frecuentes como anosmia; disgeusia, ageusia o hipogeusia; congestión nasal, dolor de garganta; cefaleas; conjuntivitis; dolores musculares o articulares; nauseas o vómitos, diarrea; erupciones cutáneas; escalofríos o vértigo. La enfermedad puede evolucionar hasta un cuadro grave, contándose entre los síntomas de agravamiento de la enfermedad la pérdida del apetito, la disnea, la confusión, el dolor en el pecho y cuadros febriles por encima de los 39 °C.

A pesar de la multitud de síntomas manifestados por la infección del virus, la mayoría de los infectados tienen síntomas leves (80 %), en tanto que un 20 % de pacientes contagiados manifiestan una enfermedad grave y finalmente alrededor del 5 % puede alcanzar niveles más críticos, desarrollando un cuadro de neumonía o síndrome de dificultad respiratoria aguda (requiriendo ventilación de tipo mecánica y hospitalización en UCI). En referencia a los cuadros graves, los hombres mayores de 65 años tienen mayor riesgo de tener un mal pronóstico de la enfermedad.

El tiempo promedio desde que se inicia la sintomatología hasta que el paciente se recupera es de 14 días cuando ha sido un cuadro leve y entre 3 a 6 semanas si ha concurrido con síntomas graves o críticos. Si bien lo anterior hace referencia a la norma, se ha puesto de manifiesto que muchos pacientes graves, al superar la enfermedad refieren signos y síntomas del COVID que se prolongan semanas o incluso meses (cansancio, cefaleas, dolor, mialgias...). Es lo que se conoce por síndrome pos-COVID-19.

Se han descrito seis medios de transmisión fundamentales: por gotas respiratorias, por aerosoles, por contacto directo por superficies contaminadas, por vía fecal-oral, por vía vertical y leche materna y por transmisión

sexual. En el campo de la odontología, las vías de contagio principales son las tres primeras. Esto ha supuesto un gran problema a nivel profesional por lo que ha habido que extremar las precauciones a la hora de tratar a los pacientes (EPIs, mascarilla FFP2, guantes, pantallas protectoras, desinfección y esterilización). Pero todos estos mecanismos de control de las enfermedades transmisibles estaban ya implantados en las clínicas dentales, por lo que los odontólogos solo han tenido que poner en funcionamiento los métodos desarrollados a partir de la pandemia de VIH de 1981 (guantes, mascarillas, gafas, autoclaves, etc.), extremándolos en los casos necesarios con pantallas, aspiración ambiental o batas impermeables. Es más que probable que debido a estas circunstancias la tasa de contagios de un colectivo profesional tan expuesto como el de los dentistas haya sido extremadamente baja, más aún si se compara con el de otros profesionales sanitarios.

Estando especialmente implicada la orofaringe en el contagio de la infección, no tardaron en comenzar a aparecer publicaciones que vinculaban el padecimiento de determinadas patologías orales, en particular de las periodontitis activas, con un empeoramiento de la enfermedad producida por el SARS-CoV-2, relacionándose, incluso, con el ingreso en la UCI y la muerte (Carod-Artal 2021; Machuca 2022).

1. EL ESTUDIO DE LAS REPERCUSIONES DE LAS ENFERMEDADES ORALES EN LA SALUD GENERAL EN LA ACTUALIDAD

En la actualidad existe una gran cantidad de literatura científica y de divulgación general relacionada con las implicaciones que la mala salud bucal pudiera tener sobre la salud general y viceversa. Desde los trabajos de Offenbacher *et al*. (1996), publicados en *Journal of Peridontology*, acerca de la relación entre el padecimiento de una periodontitis durante el embarazo y la posibilidad de un nacimiento prematuro o de bajo peso, se han multiplicado este tipo de publicaciones, habiendo trascendido su comunicación a los medios escritos y audiovisuales de divulgación general. Pero estas asociaciones presentan matices que han de ser tenidos siempre en cuanta, mucho más a la hora de establecerse las relaciones con una nueva enfermedad vírica desconocida hasta la fecha. Así, el papel de los dentistas en la pandemia COVID-19 que aún nos asola, creo que debería ser meticulosamente analizado, porque empiezan a surgir publicaciones que ponen de manifiesto que la implicación de la cavidad oral en la infección pudiera ser más que destacado.

Llegados a este punto, sería interesante puntualizar dos conceptos. Por un lado, el término «***causalidad***» se refiere al establecimiento de una relación causa-efecto: «El cambio en la frecuencia o intensidad de la exposición a un patógeno conlleva un cambio en la frecuencia o intensidad del efecto de este». El ejemplo más claro, y que habitualmente se emplea, sería la asociación entre el bacilo de Koch y la tuberculosis, en donde habría una causa necesaria o indispensables (el bacilo de Koch), que al suprimirse se erradicaría la enfermedad. En términos generales, hay dos modelos que podrían explicar esta relación de causa-efecto:

— Modelo determinista puro: Determina la causalidad como una conexión perfecta entre la causa y el efecto (en este caso la enfermedad), es decir, si ocurre la causa siempre se manifestará el efecto, pues la asociación es completa, perfecta e inequívoca. Hoy día constituye un modelo obsoleto en la mayor parte de los casos, porque muchas enfermedades tienen varios factores causales (no se cumpliría la especificidad de causa), como es el caso de las inmunodeficiencias, que pueden ser causada por radiaciones, virus... Además, ciertos factores de riesgo producen más de un efecto y, por ende, no se cumpliría la especificidad de efecto (por ejemplo, el tabaco puede producir patologías pulmonares, cardíacas...) Por eso la causa no tiene por qué producir un efecto concreto.
— Modelo determinista modificado por Rothman: Fue desarrollado por este autor en 1976, e incorpora conceptos del modelo determinista y del modelo multicausal. Parte de los conceptos básicos de que en los procesos causales:
  - Las causas no pueden ocurrir después que los efectos.
  - Los efectos unicausales no existen.
  - Niega los tiempos de inducción constantes para las enfermedades, ya que serían específicos de cada factor causal contribuyente.

En una asociación causal, las causas podrían ser de dos tipos:

— Causas necesarias: factores indispensables para que se desarrollen una serie de efectos, esto es, aquellos sin los cuales los efectos no podrían manifestarse. Es decir, la causa se puede equivaler a la causa necesaria, pues si elimino ésta, se erradica la enfermedad. Por ello, retomando el ejemplo expuesto con anterioridad, si una persona no se expone al *Mycobacterium tuberculosis,* no padecerá tuberculosis.
— Causas suficientes: aquellos diferentes factores que, en conjunto, englobando también la causa necesaria, siempre concluyen con el desarrollo del efecto. En otros términos, serían los factores de riesgo, pues si se suprimen, se modificaría la enfermedad. Siguiendo con el ejemplo anterior, en una situación de óptima higiene y buenos hábitos nutricionales, un individuo

que goza de salud se expone al bacilo de Koch, arduamente desarrollará la enfermedad de la tuberculosis. Si bien, una persona inmunocomprometida, malnutrida o situación de hacinamiento, tendrá muchas posibilidades de presentar la enfermedad. En este caso, el *Mycobacterium tuberculosis* es la causa necesaria, que sumada a la situación de inmunocompromiso, malnutrición y hacinamiento, configurarían las causas suficientes para desarrollar la enfermedad (Vargas 2013).

No obstante, esta causalidad de las enfermedades es muy difícil de demostrar, ya que necesita de costosísimos ensayos clínicos aleatorizados, de coste prohibitivo, para ganar objetividad en la comparación de parámetros para obtener evidencia científica.

Por otro lado, el término «***asociación***» hace referencia a la «dependencia estadística entre dos o más factores, de manera que la ocurrencia de un factor se modifica mientras se varía el otro estudiado». La asociación no implica forzosamente que exista causalidad. Un ejemplo habitualmente empleado es el del aumento en la frecuencia personas afectadas por la hipertensión arterial a medida que aumenta la edad de la población. En la actualidad, debido a la dificultad de desarrollar estudios que establezcan la causalidad, se intentan encontrar asociaciones potentes entre varios factores. Pero... ¿es siempre lo estadísticamente significativo, clínicamente relevante? La respuesta a esta pregunta es que en estos diseños siempre va a tener especial relevancia el sesgo del investigador y del lector del estudio. Pueden existir relaciones estadísticas sin darse relación real causa-efecto, incluso haber relaciones causales que no puedan medirse mediante pruebas estadísticas. En este sentido, una asociación estadística puede ser de tipo positiva (aumenta cuando la otra cambia) o negativa (disminuye cuando cambia la otra). A su vez, podemos establecer la siguiente clasificación de las asociaciones:

— Causales: directas (A causa B, pero sin efectos intermedios) o indirectas (A causa B, pero con otras variables participantes). Según esto se van a dar asociaciones estrechamente correlacionadas (el hábito de fumar cigarrillos y el padecimiento de un cáncer de pulmón, anteriormente comentado).
— No causales: se trata de asociaciones absolutamente espurias. Presentan importantes sesgos, que las hacen parecer como tales. Hay una serie de ejemplos muy particulares como el hecho de ver películas de Nicholas Cage y ahogarse en una piscina, o que el número de cigüeñas que aniden esté en relación con el nacimiento de bebés. Son asociaciones fortuitas, debidas al azar, esporádicas, y que, por extraño que parezca, se han estudiado (Vargas 2013; Castle 2017).

Cuando aparece una nueva enfermedad, de la que casi nada se conoce, es frecuente que empiecen a aparecer una cantidad ingente de publicaciones científicas que intente esclarecer los detalles más importantes de la misma, compitiendo los investigadores en originalidad y celeridad de presentación de sus resultados. Pero, según los criterios repasados anteriormente, será el lector el que tenga que hacer un análisis crítico de estas publicaciones, y en este sentido se ha desarrollado el presente capítulo de esta obra.

2. PAPEL DE LA OROFARINGE EN LA TRANSMISIÓN DEL SARS-COV-2

Al ser una de las principales vías de transmisión del virus las secreciones respiratorias, es conveniente que se analicen algunos datos con respecto a la misma, ya que la orofaringe parece ser la fuente principal de contagio.

La mayoría de las publicaciones muestran que el virus SARS-CoV-2, puede trasmitirse de humano a humano por diferentes vías, siendo la más importante mediante contacto directo y, por otro lado, la inhalación de gotas y aerosoles de tipo respiratorio que una persona contaminada emitiría. Esta gotas y aerosoles llegarían hasta las vías respiratorias (inferiores y superiores) de una persona con susceptibilidad para sufrir la infección.

Las secreciones respiratorias se pueden clasificar en gotas (≥ 5 micras) y aerosoles (< 5 micras). Todos los individuos, al respirar o al hablar, emiten gotas y aerosoles provenientes de las vías respiratorias de diversos tamaños (de nanómetros a cientos de micrómetros), pero en su mayoría son de reducido tamaño (< 2,5 micras). En una estimación, en los pulmones se generan unos 500 aerosoles por litro de aire espirado, y al toser o al estornudar, se producen unas 3.000 y 40.000 partículas respectivamente, de un tamaño de entre 1-10 micras, provenientes de las vías respiratorias superiores (Amorim dos Santos *et al*. 2021a). En la actualidad tiende a considerarse que los aerosoles contienen el virus con viabilidad y con capacidad de infectiva, sobre todo en situaciones de proximidad durante un largo tiempo y espacios cerrados con mala ventilación. Además, pueden coexistir diferentes mecanismos de transmisión (Amorim dos Santos *et al*. 2021; Parra-Sanabria *et al*. 2020), y, por si fuera poco, existen ciertos tejidos diana que pueden tener accesibilidad para aerosoles de diversos tamaños, con vías de entrada en cualquier lugar de la vía respiratoria.

Además, el contagio se puede ocasionar por un contacto de carácter indirecto (a través de manos, objetos contaminados con secreciones respiratorias de un enfermo...). Sin embargo, no se han encontrado evidencias de casos por transmisión únicamente a través de superficies contaminadas (fómites). Los individuos que puedan

tener contacto con superficies probablemente contaminadas, también lo suelen hacer con personas que padecen la enfermedad, lo que podría dificultar la justificación de esta vía de transmisión. Cabe remarcar que, la transmisión por fómites, con ausencia de limpieza o desinfección, es factible debido a la contaminación viral de algún individuo infectado con un virus viable. El resto de las vías de transmisión parecen ser muy poco probables (Amorim dos Santos *et al*. 2021a; Santos *et al*. 2021).

3. PAPEL DE LOS RECEPTORES PARA ANGIOTENSINA II (ACE2) DE LA OROFARINGE EN LA TRANSMISIÓN DEL SARS-COV-2

En este momento cobra especial importancia el papel de los receptores para la enzima convertidora de angiotensina 2, o receptores ACE2. Actualmente, numerosos estudios apuntan en el sentido de que el SARS-CoV-2 actúa invadiendo las células humanas a través este receptor (ACE2).

Parece ser que el virus SARS-CoV-2, accede al organismo a través de la boca o la nariz (mediante los aerosoles o las gotas de Flüge) y se introduce en la célula utilizando como receptor el ACE2, una exopeptidasa de membrana que se encuentra principalmente en riñón, corazón y pulmones, pero también en la orofaringe (Panda *et al.* 2021). La función fundamental de la ACE2 es la transformación de la angiotensina I en angiotensina 1-9 y de la angiotensina II en angiotensina 1-7. Todos estos productos van a tener acciones antinflamatorias, efectos de tipo vasodilatador, antifibrosis y aumento de la natriuresis (excreción de sodio a través de la orina). Es decir, efectos fundamentalmente reductores de la tensión arterial, contra regulando la acción de la angiotensina II. Por tanto, la ACE2 se ha podido relacionar con efectos protectores frente a la arteriosclerosis, hipertensión y otras enfermedades vasculares y pulmonares. La enzima convertidora de angiotensina 2, es una proteína que actúa como único receptor del SARS-CoV-2 para poder invadir las células y causar una infección en humanos. A pesar de que el virus ataca fundamentalmente a través del sistema respiratorio, se identificó la expresión del gen ACE2 en otros tejidos, incluyendo gastrointestinal y cutáneo (Nemeth-Kohanszky *et al*. 2020).

El SARS-CoV-2 actuaría invadiendo las células hospedadoras (nasales, epiteliales, bronquiales...) a través de una glucoproteína estructural denominada «Spike» (proteína S), que se encuentra en la superficie del virus. Esta proteína consta de dos subunidades. La primera de ellas, la S1, es la que se ocupa del proceso de unión al receptor ACE2 de la célula hospedadora, considerándose como el receptor funcional del SARS-CoV-2 y que posee una elevada expresión en los órganos corazón, pulmón, riñón, vejiga e íleon, incluso en el epitelio de glándulas salivales y papilas gustativas. Esta primera subunidad, se puede dividir, a su vez, en dos porciones: N-Terminal (NTD) y C-Terminal (Dominio C). Los coronavirus suelen emplear principalmente el Dominio C para unirse al receptor (Singh *et al*. 2021). La subunidad S2 sería la encargada del proceso de fusión entre las membranas viral y celular.

Cuando el virus infecta la célula huésped, se acelera su replicación, afectando la barrera epitelial del endotelio y generando una infección en los capilares pulmonares y células endoteliales, incrementando la respuesta inflamatoria. En estadios avanzados y severos de la patología, se puede ocasionar una «tormenta de citoquinas» y una respuesta sistémica no controlada, por la gran liberación de estos mediadores de la inflamación. Esto podría traer como consecuencia un síndrome de distress respiratorio agudo, que se ha establecido como la causa primordial de la muerte por la COVID-19 (Singh *et al*. 2021).

Se ha observado, en los casos de más gravedad, que los niveles de angiotensina II se presentan elevados, correlacionándose el nivel de angiotensina II con la carga viral de SARS-CoV-2 y el posible daño pulmonar. El desequilibrio presentado en el sistema renina-angiotensina-aldosterona podría estar relacionado con la inhibición que el virus produce sobre la ACE2.

4. LA CAVIDAD ORAL COMO PUERTA DE ENTRADA DEL SARS-COV-2

A pesar de que las manifestaciones orales se han descrito desde que se descubrió al virus, la cavidad oral, al principio, no fue objeto de una evaluación meticulosa y continuada. Con el avance de la pandemia y el auge de las investigaciones sobre la COVID-19, se ha establecido que la cavidad oral podría ser una de las principales vías de infección por el SARS-CoV-2. Este hecho va a tener una serie de consecuencias, de distinto signo, puesto que por un lado tendría una importante repercusión en la asistencia odontológica, debido a su alto riesgo de transmisión en el gabinete dental, y, por otro lado, tendría consecuencias favorables, tales como la facilidad que generaría el potencial uso de la saliva para el diagnóstico de la infección.

Ya se ha visto como las principales vías de entrada del virus parecen ser boca, nariz y ojos, a través de las mucosas de dichos órganos. Anteriormente se ha recordado la importancia que el receptor de angiotensina 2 (ACE2) parece tener en el contagio por el virus. Aunque la evidencia aún es limitada, hay estudios que evidencian la presencia de la enzima convertidora de angiotensina 2 en los tejidos orales, sobre todo en las glándulas

salivales y en las células de la mucosa oral (principalmente en el dorso lingual). Como es fácil de entender, todas aquellas células con una elevada densidad de receptores ACE2 podrían transformarse en células hospedadoras del virus, actuar como puerta de entrada de la infección, y, por tanto, producir una respuesta inflamatoria en los tejidos. Esta circunstancia podría ser la responsable de la particular sensibilidad de las papilas gustativas ante la presencia del SARS-CoV-2, siendo el virus capaz de inducir las características respuestas gustativas disfuncionales (Panda *et al*. 2021).

Una vez que el SARS-CoV-2 contacta con las células epiteliales (por medio de aerosoles, gotas respiratorias o fómites) de la cavidad oral de un paciente susceptible, localizará al receptor de la ACE2 para unirse al mismo (mediante la glicoproteína de superficie). Tras producirse la unión, los receptores serían activados por la proteasa transmembrana, la TMPRSS2, para ingresar el virión en la célula huésped (Pastrian-Soto 2020). Una vez en el interior celular, quedaría el RNA viral libre en el citoplasma de la célula, pues el SARS-COV-2 no se trasladaría hasta el núcleo para insertar la secuencia vírica. Para ello el ribosoma se encargaría de iniciar los procesos de replicación, transcripción y traducción de las proteínas víricas (Cuevas-González *et al*. 2021) Finalmente, se conformaría una nueva vesícula que daría lugar a un nuevo virión que saldría por exocitosis de la célula huésped, preparado para infectar más órganos u individuos susceptibles hasta realizar numerosas copias virales con una carga vírica infecciosa (Pastrian-Soto 2020).

Si este mecanismo descrito esquemáticamente fuese exacto, la infección por el virus SARS-CoV-2, podría derivar en las manifestaciones patológicas relacionadas con la salud bucodental que se han ido describiendo. Algunos de los signos y síntomas orales que se relacionan con la COVID-19 son principalmente los trastornos del gusto, la gingivitis de tipo descamativa, las ulceraciones inespecíficas en la cavidad oral, las petequias en la mucosa oral y la aparición de coinfecciones (principalmente candidiasis). No obstante, hay aún muchas lagunas acerca de si estos signos y síntomas son un patrón típico de la COVID-19, como resultado de una infección local directa o, si, por otro lado, pudiera ser la manifestación sistémica de las coinfecciones, de los efectos secundarios del tratamiento o del detrimento del sistema inmune (Pansa *et al*. 2021).

5. CRITERIOS DE CAUSALIDAD Y ASOCIACIÓN DE LA LESIONES ORALES PRODUCIDAS POR EL SARS-COV-2

Llegados a este punto, se considera de trascendental importancia conocer si los mecanismos descritos con anterioridad están directamente relacionados con la infección en una relación de causa-efecto, o si por el contrario se trata de asociaciones causales o espurias. Ha de tenerse en cuenta la repercusión que podrían tener todas las aseveraciones vertidas en este texto, en relación con la asistencia odontológica y la salud de los pacientes, de tal manera que pudiera ser que el papel de los dentistas fuera trascendental a la hora del diagnóstico y/o el tratamiento de los infectados. Es necesario puntualizar de una manera lo más meticulosa posible estas circunstancias, ya que, de demostrarse una causalidad o una asociación con una causalidad muy constatable, habría que implementar la asistencia odontológica de estos pacientes como una prioridad sanitaria.

Aunque eran numerosos los trabajos publicados acerca de la aparición de lesiones orales específicas compatibles con la infección por el SARS-CoV-2, realmente se describían lesiones bastante inespecíficas. Actualmente existen un limitado número de artículos que aborden la prevalencia de las manifestaciones orales en individuos infectados con la COVID-19 y que empleen métodos de detección apropiados, de manera que resulta difícil comprobar las evidencias científicas existentes acerca de los criterios de causalidad y asociación de las lesiones orales del SARS-CoV-2. Era difícil establecer una relación causa efecto entre las lesiones orales descritas y la infección por este coronavirus, aunque sí podría determinarse cierto grado de asociación entre la infección por el SARS-CoV-2 y los trastornos del gusto, en particular la disgeusia. No se encontraron datos concluyentes para asociar de manera directa esta infección con otros síntomas o enfermedades propias de la cavidad oral, como determinadas lesiones ulcerativas, xerostomía, parotiditis, o la halitosis. Todas estas lesiones parecen tener un origen muy inespecífico y una presentación muy errática en la infección que nos ocupa (Machuca 2022). De cualquier forma, tras realizarse la lectura pormenorizada de las revisiones sistemáticas más acreditadas, pueden determinarse los siguientes tipos de lesiones en la mucosa oral a causa del SARS-CoV-2, que se enumeran en base a su posible relación de causalidad o asociación directa:

5.1. Trastornos del gusto

La alteración gustativa se puede considerar la manifestación oral más prevalente entre los individuos positivos en COVID-19. De acuerdo con Brandão *et al*. (2020), sobre todo en los casos leves y moderados, los pacientes desarrollan en las primeras etapas de la enfermedad síntomas referentes al trastorno del gusto, tales como la disgeusia (38 %), hipogeusia (35 %) y ageusia (24 %). Según estudios realizados por diferentes autores, la disgeusia (trastorno en el cual hay un mal sabor permanente

en la boca, pudiendo ser salado, metálico o rancio) es el síntoma más común, rozando una presencia del 80 % entre los individuos positivos. (Amorim dos Santos *et al*. 2021a; Amorim dos Santos *et al*. 2021b). Para Aragoneses *et al*. (2021), la alteración gustativa tiene una prevalencia del 45 %, siendo la manifestación oral más frecuente. Los mismos autores, en otro estudio posterior encuentran que los trastornos del gusto eran el síntoma oral más prevalente (38 %) tras la xerostomía (43 %) (Agyeman *et al*. 2020).

Las disfunciones gustativas son más frecuentes en pacientes de menor edad, que suelen presentar un curso leve de la enfermedad. Según Agyeman *et al*., las personas de edad avanzada tienen mayor riesgo de tener una infección grave por COVID-19, pero con menos disfunciones gustativas (Agyeman *et al*. 2020; Amorim dos Santos *et al*. 2021b).

En cuanto a la prevalencia por sexos, se ha descrito en algunos estudios que la regulación hormonal y la respuesta inmune, parecen estar incrementadas en las mujeres, sobre todo en las de avanzada edad, lo que podría derivar en una mayor disfunción del sistema gustativo y más propensión a la pérdida del gusto. Parece ser que el papel que jugaría la reducción de los estrógenos en la menopausia pudiera tener un papel primordial. Por un lado, con respecto a la salud bucal, los estrógenos estimularían a las células serosas bucales que producen saliva y como consecuencia, aparecería la sensación de boca seca, o que podría contribuir a la aparición cuadros clínicos tales como la pérdida de gusto. Por otro lado, los estrógenos se unen a los receptores celulares expresados por muchas células inmunitarias (linfocitos, neutrófilos, macrófagos). Ante el descenso de esta hormona en la menopausia, se podría reducir la inmunidad de las mujeres ante infecciones víricas como la COVID-19. Se necesitarían más estudios para confirmar si las diferencias entre hombres y mujeres en la prevalencia y en la manifestación de los síntomas orales sería por causa exclusiva del virus o si por el contrario la respuesta inmune modulada por estos factores hormonales pudiera tener una trascendencia especial (Agyeman *et al*. 2020; Amorim dos Santos *et al*. 2021; Salas-Orozco *et al*. 2021; Orilisi *et al*. 2021).

Pudiera ser que los occidentales fueran más susceptibles a la disgeusia que los asiáticos. Hay una expresión diferente de los receptores ACE2 entre ambas poblaciones, explicándose así la prevalencia variable: un 49 % en Europa frente al 14 % en África. Esto reafirma la hipótesis de la interacción que se podría dar de forma directa entre el SARS-CoV-2 y los receptores ACE2, ya que el polimorfismo genético surgió en el gen ACE2 como regulador de las diferentes interacciones intermoleculares de la COVID-19. A pesar de los estudios existentes, serían necesarios otros adicionales mejor diseñados para evaluar las diferencias étnicas (Amorim dos Santos *et al*. 2021b; Zhao *et al*. 2020).

Aunque la patogenia de los trastornos gustativos en individuos positivos en la COVID-19 no se comprende por completo, se han planteado varias hipótesis.

Según Mahmoud *et al*. (2021), el neurotropismo podría explicar las alteraciones del gusto y del olfato, pues el daño ocurriría, bien a través del sistema nervioso central al tener una elevada expresión de ACE2 en las células endoteliales y neuronas, o bien atravesando el virus el epitelio olfativo de forma directa a través de la placa cribosa para llegar al SNC. En cambio, Sakaguchi *et al*. (2020), observaron que las papilas gustativas del epitelio escamoso estratificado lingual, las papilas fungiformes y las células gustativas presentaban la proteasa transmembrana serina proteasa 2, lo que pudiera ser una explicación de la pérdida del gusto de los pacientes infectados.

Chary *et al*. (2020) propusieron diferentes teorías. La primera de ellas se fundamentaría en que la invasión del virus en las células epiteliales linguales y en las papilas gustativas principalmente, podría producir una estomatitis localizada que conduciría a una alteración de la función de las papilas gustativas. La segunda teoría, sería que la infección podría desencadenar una respuesta inmune con producción de anticuerpos, que atacarían al virus y a las células de la cavidad oral (incluyendo las células de las papilas gustativas). Esta teoría es respaldada por varios estudios, en los cuales se demuestra que los receptores gustativos tipo 2 participan de una manera efectiva en la respuesta inmunitaria. Y, finalmente, la tercera teoría propone que las alteraciones del gusto y del olfato serían efectos secundarios de los fármacos utilizados para combatir la infección.

Para Amorim Dos Santos *et al*. (2020), la interacción del SARS-CoV-2 con los componentes gustativos y los receptores ACE2 justificaría el efecto directo de las alteraciones gustativas relacionadas con la COVID-19. En este sentido, detallaron las siguientes hipótesis:

— El sistema nervioso central se afectaría directamente por la infección. Este, a su vez, inervaría los botones gustativos y podría afectar las funciones relacionadas con los mismos, lo que produciría las mencionadas alteraciones del gusto.
— El SARS-CoV-2 se uniría al ácido siálico de la mucina salival, lo que podría acelerar la degradación de las papilas gustativas y, por consiguiente, alteraría el sentido del gusto.
— La lengua contiene una alta expresión de receptores ACE2, y con la infección por el SARS-CoV-2 podrían alterarse las funciones del gusto a través de la regulación de las vías de síntesis de la serotonina y de la dopamina.

— Los fármacos también podrían causar la disregulación gustativa: los inhibidores de la enzima angiotensina convertasa (IECA) y bloqueadores de la ACE2 podrían deteriorar la función gustativa por la inactivación de los canales de sodio acoplados a la proteína G.

En su segundo estudio, estos autores concluyeron que habría una expresión diferente de los receptores ACE2 en las distintas poblaciones. Esto justificaría la hipótesis de la interacción directa entre el SARS-CoV-2 y los receptores ACE2, pues el polimorfismo genético surgiría en el gen ACE2 como regulador de las diferentes interacciones intermoleculares de la COVID-19. Además, habría una expresión de ACE2 en la superficie lingual, por lo que las alteraciones del gusto podrían estar justificadas (Amorim Dos Santos *et al*. 2021b).

En la revisión de Agyeman *et al*. (2020), los autores expusieron que las alteraciones en el volumen y la composición salival podrían alterar el gusto. Según estudios realizados en macacos, las células epiteliales que envuelven los conductos de las glándulas salivales serían el primer objetivo de la infección por el SARS-CoV-2 en las vías respiratorias superiores.

A pesar de que la mayoría de los estudios apuestan por una relación estrecha entre la infección por SARS-CoV-2 y las alteraciones gustativas (que se ha identificado como síntoma de infección temprana, que tendría como consecuencia clínica el aislamiento para reducir la propagación del virus), todavía no hay una evidencia alta que aclare la participación de la COVID-19 en la cavidad oral (Uzêda-E-Silva *et al*. 2021).

5.2. Xerostomía

La xerostomía o sensación subjetiva de sequedad de boca, se muestra como un signo muy común del SARS-CoV-2 en la cavidad oral, pudiendo alcanzar una elevada prevalencia (Agyeman *et al*. 2020; Bhujel *et al*. 2021). En este sentido, Chen *et al*. (2020), en su estudio llevado a cabo en 108 pacientes positivos, determinaron que los síntomas más comunes en la cavidad oral fueron la sequedad de boca (46,3 %) y los trastornos gustativos (47,2 %).

La xerostomía podría ser un síntoma de carácter inespecífico con diversas causas posibles, siendo la hiposalivación el principal factor causal. También se puede asociar a ciertos medicamentos, a la rinorrea, a la respiración bucal, a déficit de nutrientes, a la ansiedad, a la diabetes o a la hospitalización prolongada (Orilisi *et al*. 2021).

Se sugiere que el virus pudiera invadir de forma directa los sistemas nerviosos periférico y central, lo que, junto a la expresión de la ACE2 y el TMPRSS2 en el epitelio de la mucosa y de las glándulas salivales, explicarían las lesiones derivadas de la infección. Se vio como el virus usa el receptor ACE2 para la entrada en las células del huésped y la serina proteasa TMPRSS2 para el cebado de la proteína S. Sakaguchi *et al*. (2020), a través de pruebas inmunohistoquímicas, localizaron a la TMPRSS2 en numerosas células de la cavidad oral, tales como en las células epiteliales de las papilas gustativas, las células de los epitelios escamosos lingual y gingival y las células ductales y serosas de las glándulas submandibulares, lo que justificaría la tendencia a la sequedad bucal.

5.3. Halitosis

La halitosis o mal aliento no ha sido descrita con mucha frecuencia en los estudios relacionados con esta infección. Como se ha explicado con anterioridad, en las glándulas salivales hay una expresión considerable de ACE2. Según Amorim dos Santos *et al*. (2021a), la infección de las glándulas salivales por el SARS-CoV-2 podría producir también un deterioro de la calidad de la saliva y del flujo salival, causando la mencionada halitosis, junto con las otras alteraciones ya revisadas.

5.4. Parotiditis y sialoadenitis

Se han descrito algunos casos de parotiditis y sialoadenitis en pacientes afectados por la COVID-19. El SARS-CoV-2 se uniría a las células epiteliales que recubren los conductos de las glándulas salivales a través de los receptores ACE2. Tras su fusión y su replicación en las células, induciría los síntomas de hinchazón y dolor en las glándulas salivales, que daría lugar a este doloroso cuadro. (Aragoneses *et al*. 2021).

5.5. Lesiones en la mucosa oral

Las lesiones que se han descrito como de posible aparición en la mucosa oral como consecuencia de esta infección son múltiples y variadas. Dentro de ellas, **la lesión ulcerosa tipo aftosa** es la más frecuentemente descrita, seguida de la **queilitis angular**, de las **lesiones herpéticas**, de la **candidiasis** y de ciertas **lesiones linguales** (glositis, depapilación, lengua geográfica) (figs. 1-4). Estas manifestaciones no se suelen localizar en un lugar específico, pudiéndose afectar las encías, la mucosa bucal, la lengua, el paladar y los labios (Agyeman *et al*. 2020; Erbaş *et al*. 2021).

Las lesiones presentan una apariencia clínica diferente según los infectados, en cuanto a cantidad de las mismas, aspecto, color y localización. Esto parece ser debido a que es poco frecuente que un único virus se relacione con un solo patrón de lesiones orales. Por ello se piensa que las lesiones pudieran estar relacionadas con



Figura 1. Paciente de 68 años COVID + y diabético tipo 2. Presenta úlceras y ampollas en la mucosa oral, con afectación de la mucosa labial externa. Se observan costras en dicha mucosa, y afectación de la mucosa lingual en forma de ampollas. Imagen cortesía de las Dra. Somacarrera Pérez y Dra. Martín Carreras-Presas. Práctica privada en Madrid



Figura 2. El mismo paciente de la figura 1. Se observa la mucosa labial superior interna con presencia de ampollas. Imagen cortesía de la Dra. Somacarrera Pérez y Dra. Martín Carreras-Presas. Práctica privada en Madrid



Figura 3. El mismo paciente de la figura 1. Evolución de las lesiones de la mucosa labial superior interna, al mes de la aparición de las lesiones iniciales. Imagen cortesía de la Dra. Somacarrera Pérez y Dra. Martín Carreras-Presas. Práctica privada en Madrid



Figura 4. El mismo paciente de la figura 1. Resolución completa de las lesiones de la mucosa labial externa y mucosa lingual. Imagen tomada 1 mes de las lesiones iniciales. Imagen cortesía de la Dra. Somacarrera Pérez y Dra. Martín Carreras-Presas. Práctica privada en Madrid

otros factores como las coinfecciones (sobre todo bacterianas y fúngicas), las reacciones adversas a los fármacos o al deterioro inmune. Según Orilisi G *et al*. 2021, posiblemente por el control que se les hace a los pacientes, en el entorno hospitalario es donde se suelen identificar con más frecuencia estas lesiones. Según este estudio, las manifestaciones que se suelen dar antes del ingreso se localizan en el paladar duro, los labios y la lengua. Ejemplo de estas lesiones son las úlceras dolorosas, las queilitis y las lesiones linguales (lengua geográfica y fisurada, glositis, lengua en fresa y depapilación lingual). En cambio, durante el ingreso en el hospital, pueden aparecer otras lesiones, como las úlceras por presión, la macroglosia, ampollas, queilitis angular y candidiasis oral. Suelen estar localizadas, en su mayoría, en el dorso lingual, los labios y la mucosa bucal. Según estos autores, pudiera ser que las lesiones que se dan antes del ingreso hospitalario estuvieran en relación directa con la COVID-19, mientras que las manifestadas en el hospital, obedecerían a causas muy dispares (Erbaş *et al*. 2021; Uzêda-E-Silva *et al*. 2021).

Se siguen intentando averiguar cuál sería la patogenia de las lesiones de la cavidad oral. Sin embargo, la hipótesis que sostiene que el SARS-CoV-2 usa la elevada expresión de la ACE2 en los tejidos orales para ingresar a las células de las vías respiratorias y producir las diferentes manifestaciones orales, es la más repetida. Como se ha visto, los receptores ACE2 y TMPRSS se expresan en multitud de tejidos y células de la cavidad oral, sobre todo en las glándulas salivales (mayores y menores) y en las células epiteliales linguales (coinciden con los lugares anatómicos orales en los que se manifiesta la sintomatología clínica en pacientes positivos). Tras la unión a las células diana, la COVID-19 puede inducir infecciones en la superficie oral. Aparte de los receptores más estudiados, exponen que el biomarcador interleucina 6 (Il-6) estaría relacionado con la tormenta de citoquinas y el deterioro del sistema inmune. Es por ello por lo que

algunas lesiones como la lengua geográfica, podrían asociarse a niveles elevados de Il-6, aunque la evidencia es muy limitada (Agyeman *et al*. 2020; Amorim dos Santos *et al*. 2021a).

Otros autores, como Sarode *et al*. (2020), sugieren que la coinfección por hongos, bacterias o virus sería la causa de algunas lesiones, tales como las úlceras orales (necróticas y aftas), las cuales suelen localizarse en el paladar, los labios, la orofaringe y la lengua. En cambio, Uzêda-E-Silva *et al*. (2021), aseguran que muchas de estas lesiones (como sería el caso del eritema multiforme) pudieran ser producidas por factores psicosociales que deprimen el sistema inmunológico (estrés), tratamientos médicos, o la hospitalización prolongada (Erbaş *et al*. 2021). Estas lesiones ulcerativas (úlceras inespecíficas, ulceraciones tipo aftosas, estomatitis herpéticas, eritema multiforme) se manifestarían con mayor frecuencia a medida que avanzara la enfermedad. Pueden llegar a observarse en un 65 % de los individuos positivos, y se suelen localizar en el paladar, la lengua, los labios y las mejillas. Para casi ningún autor parece quedar claro si estas lesiones pudieran ser una causa directa de la infección por SARS-CoV-2, o no. Según Xu *et al*. (2020), pudiera deberse, como ya se ha explicado con anterioridad, a la elevada expresión de la ACE2 en la mucosa oral, sobre todo en la lengua y en las glándulas salivales. El resultado de la interacción entre el SARS-CoV-2 y la ACE2 desregularía la función de los queratinocitos de la cavidad oral y produciría úlceras orales dolorosas. También se han relacionado las lesiones ulcerosas con la tormenta de citoquinas.

Las lagunas existentes acerca de si estas lesiones son resultado de la infección directa del SARS-CoV-2 o por otras causas se acrecientan en los pacientes encamados en unidades de cuidados intensivos (UCI) durante prolongados períodos de tiempos. Existen diferentes factores de riesgo, como pueden ser la intubación endotraqueal del equipo de ventilación mecánica y la posición prona prolongada, que podrían explicar las lesiones ulcerosas por presión (periorales, linguales y labiales), y favorecería la aparición de otras lesiones ocasionadas por las infecciones, la inmunodepresión, el estrés, los fármacos, los traumatismos, etc. Según Aragoneses *et al*. (2021), los pacientes mayores de 60 años ingresados en UCI e índice de masa corporal superior a 28,5kg/m^2 son más susceptibles a tener este tipo de úlceras.

También se ha descrito la aparición de **lesiones vesiculoampollosas**. Martín *et al*. (2021) identificaron algunas lesiones herpetiformes en pacientes con test positivos, las cuales tendrían semejanza con la angina bullosa hemorrágica y las vesículas orales. Se suelen localizar en la lengua y el paladar. Su factor causal, de nuevo, no quedaría claro, pues podría ser el resultado del mismo SARS-CoV-2 o bien de los tratamientos, infecciones, estrés, enfermedades inflamatorias, neutropenia, el trauma mecánico y la mala higiene oral.

Las coinfecciones oportunistas, sobre todo bacterianas y fúngicas, son frecuentes en las enfermedades respiratorias de gravedad, por lo que la producida por el SARS-CoV-2 no podría ser menos. En general, los ingresos hospitalarios son un factor de riesgo para las infecciones nosocomiales como las infecciones por herpes simple o la candidiasis. La **gingivoestomatitis herpética** normalmente acompaña a un estado de depresión inmunitaria. En cambio, las **infecciones fúngicas** suelen aparecer por la disbiosis tras las terapias con antibióticos, siendo la lengua la principal afectada. Ambas pueden darse en pacientes positivos por la COVID-19, pues su sistema inmune estaría deprimido y, además, muchos de ellos serán tratados con antibióticos por la aparición de neumonías. Merece la pena destacar que el hongo *Candida albicans*, puede llegar a estar presente en el 22,7 % de individuos positivos. En estados de alteración del sistema inmune, *Candida albicans*, puede ser causa de infecciones de la la piel y mucosas, e incluso provocar infecciones sistémicas (Bhujel *et al*. 2021).

En los casos de infección por el SARS-CoV-2, la candidiasis se manifiesta mediante la aparición de placas blancas en el dorso lingual, la encía y el paladar. Diversos autores sugieren que podría relacionarse con el tratamiento antibiótico prolongado, el deterioro del estado general o una higiene oral insuficiente. Por tanto, seguramente sería un efecto secundario de la COVID-19 y no una causa directa del virus, aunque Dziedzic *et al*. (2020), exponen que estas manifestaciones podrían tener su origen en la relación compleja entre el SARS-CoV-2 y el microbioma.

Llegados a este punto, debería tenerse en cuenta el hecho de que muchas lesiones que se han asociado a la COVID-19 (enantema, sangrado gingival, ulceraciones, placas, gingivitis descamativa, inflamación de las papilas, pápulas y lesiones vesiculoampollosas), se asemejan a las manifestaciones orales producidas por otras infecciones virales. Es por ello, que sería de gran importancia hacer un exhaustivo diagnóstico diferencial con esas otras enfermedades que se manifiestan en la mucosa oral sería el caso de la mononucleosis infecciosa, el sarampión, la herpangina, la fiebre aftosa, el herpes simple tipo I (VHS-1) o el herpes zóster. Para Orilisi *et al*. (2021), la respuesta inmune del organismo a la infección por la COVID-19, activaría también a las células de Langerhans y a los linfocitos, produciendo una trombocitopenia y una vasculitis. Ésta podría ser la causa de que aparecieran lesiones orales relacionadas con trastornos vasculares tales como petequias, eritema, mucositis...

También se han identificado algunas lesiones que podrían ser resultado de un compromiso multiorgánico. Una de ella es la enfermedad de Kawasaki, la cual se caracteriza por labios agrietados, queilitis y la lengua de fresa (que suele ser el hallazgo más común). Este síndrome inflamatorio multisistémico se relacionaría con un estadio grave de la enfermedad y la hospitalización consiguiente, y se piensa que sería el resultado de la tormenta de citocinas proinflamatorias provocada por la infección viral. También, se han descrito casos de urticaria y angioedema en la cavidad oral en pacientes positivos, en relación con casos de eritema multiforme en aquellos individuos que se encontraban bajo una terapia farmacológica intensa. Y en última instancia, habría que destacar el síndrome pos-COVID-19. Amorim dos Santos *et al*. (2021a), apostaban que en este síndrome pudiera existir más riesgo de que apareciera una necrosis avascular por el tratamiento con corticosteroides.

5.6. Salud periodontal e infección por el virus SARS-CoV-2

Anteriormente se ha hecho referencia a los estudios de Offenbacher *et al*. (1996) acerca de la relación entre el padecimiento de una periodontitis durante el embarazo y la posibilidad de un nacimiento prematuro o de bajo peso, como el punto de arranque de una preocupación masiva de los dentistas por la repercusión que las enfermedades orales pudieran tener sobre las estrictamente estomatológicas y viceversa. Y no es casualidad que esta preocupación provenga del campo de la Periodoncia, puesto que desde mucho antes se habían publicado numerosos artículos a este respecto. Al tener las enfermedades periodontales su origen en una respuesta particular del hospedador frente a las bacterias que invaden el surco periodontal, desencadenándose alteraciones varadas en la respuesta inflamatoria a las mismas, estas afecciones siempre han estado en el punto de vista de su posible asociación con la patología sistémica. Tanto es así, que se aceptó que el origen y el desarrollo de la gingivitis (enfermedad habitualmente reversible, consistente en la inflamación gingival) como el de la periodontitis (enfermedad mucho más grave, y que suele cursar con la destrucción del soporte periodontal) podría estar controlado en diferente medida por una serie de desórdenes y trastornos sistémicos raros o comunes. De esta manera, el periodonto también podría estar afectado directamente, independientemente de la inflamación inducida por el biofilm oral. Es por ello, que estas enfermedades y trastornos sistémicos han sido recientemente clasificadas en el grupo 3 de la «*Classification of Periodontal and Periimplant Diseases and Conditions (2017), Chicago*» (Jepsen *et al*. 2018), nueva clasificación de las enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias, elaborada en coordinación entre la Academia Americana de Periodoncia y la Federación Europea de Periodoncia. En ella se hacía hincapié en aquellas enfermedades que tuvieran efectos predominantes sobre la destrucción del periodonto y condiciones o factores de riesgo, y las enfermedades y trastornos que condujeran a destrucción periodontal independientemente de las respuestas inmunoinflamatorias inducidas por presencia del biofilm oral (Bullón B *et al*., en prensa).

Desde poco después del inicio de la pandemia comenzaron a aparecer algunos estudios que relacionaban la gravedad de la infección por el SARS-CoV-2 con el estado periodontal de los pacientes. De hecho, algunos estudios hacían referencia a la detección del virus en el surco periodontal y en el flujo crevicular de los pacientes infectados (Matukc *et al*. 2020; Gupta *et al*. 2021). Pero ¿hasta qué punto podría afirmarse en la actualidad que esta asociación es directa? La realidad es que, a fecha de redacción de este capítulo son muy pocos los estudios con un diseño experimental adecuado que pudiera validar esta aseveración, si bien, a partir de 2022 han aparecido un cierto número de estudios de cohortes y de casos y controles que establecerían una relación directa entre ambos procesos nosológicos (Anand *et al*. 2022; Guardado-Luevanos *et al*. 2022; Gupta *et al*. 2022). Desde finales del pasado año, y a lo largo del presente han aparecido varios estudios que parecen identificar rasgos de comorbilidad entre las periodontitis y un desarrollo adverso de la infección por el SARS-CoV-2, de tal manera que, según algunos de estos trabajos, los pacientes con peor estado periodontal tendrían más posibilidades de desarrollar una enfermedad sistémica más grave y de necesitar atención en una UCI. Debería tenerse en cuenta el metaanálisis publicado por Baima *et al*. (2022) en *Journal of Dental Research* en junio de este mismo año, en el que se evaluaban críticamente los descubrimientos de investigación recientes que vinculaban la periodontitis con la infección por el SARS-CoV-2 y con la COVID-19 grave, con un enfoque especial en los mecanismos biológicos asociados y la evidencia epidemiológica disponible. A pesar de que se constataba como los principales receptores y correceptores del SARS-CoV-2 (ACE2, TMPRSS2, furina, CD147) se sobreexpresaban en los tejidos periodontales de los pacientes con periodontitis, y la inflamación, los patógenos periodontales y la piroptosis inducida por el daño desencadenaban un ciclo de retroalimentación positiva, sin embargo, los metaanálisis de estudios epidemiológicos solo indicaron una tendencia no estadísticamente significativa de un mayor riesgo de infección por SARS-CoV-2 en sujetos con periodontitis.

Sin embargo y paradójicamente, la periodontitis parece poder empeorar los cursos clínicos de la COVID-19

a través de múltiples vías directas e indirectas, incluido el daño a las vías respiratorias inferiores debido a la aspiración de patógenos periodontales, la exacerbación de la tormenta de citocinas a través de la inflamación sistémica crónica de bajo grado y la diseminación del SARS-CoV-2 a través del epitelio gingival ulcerado con la consiguiente vasculopatía inducida de los vasos pulmonares. De hecho, los metaanálisis de estudios epidemiológicos indicaron que los sujetos con periodontitis tienen más probabilidades de experimentar un curso más severo de la COVID-19. Específicamente, la periodontitis se asoció con un aumento de 4 veces en las probabilidades de hospitalización, de 6 veces en la necesidad de ventilación asistida, y de más de 7 veces en la muerte por complicaciones de la infección. Los autores de este análisis enfatizaban sobre la relevancia de la conexión boca-sistémica como objetivo para mitigar la emergencia actual de la COVID-19 y las futuras pandemias de coronavirus previstas.

5.7. Conclusiones acerca de la relación entre el SARS-CoV-2 y las lesiones de la cavidad oral

1. Según la revisión narrativa realizada, las manifestaciones orales más frecuentemente descritas en la literatura científica en relación con la infección por el virus SARS-CoV-2 son: ageusia, hipogeusia, disgeusia, xerostomía, lesiones ulcerativas y coinfecciones.
2. Según la revisión llevada a cabo, no habría datos suficientes, ni estudios adecuados que avalaran la existencia de una relación causa efecto entre la infección causada por el SARS-CoV-2 y las enfermedades de la cavidad oral.
3. A la luz de los datos analizados, parece existir cierto grado de asociación entre la infección por el SARS-CoV-2 y los trastornos del gusto, sobre todo la disgeusia. No existen datos concluyentes acerca de la asociación entre esta infección y otras enfermedades y/o lesiones orales como lesiones ulcerativas, xerostomía, parotiditis, halitosis...
4. Con respecto a si el padecimiento de una periodontitis activa podría determinar un empeoramiento en el desarrollo de la enfermedad por este coronavirus, y aunque a la luz de los textos consultados sería interesante tratar, inactivar y mantener inactiva dicha periodontitis, harían falta muchos más estudios bien diseñados para establecer dicha asociación. No obstante, dejando aparte la disgeusia, parece ser la enfermedad oral con una mayor relación con la infección por el SARS-CoV-2.
5. Se hace patente la necesidad de estudios concluyentes acerca de la relación entre el SARS-CoV-2 y las lesiones de la cavidad oral. Así mismo, se hace necesario un mayor nivel de contención en las conclusiones de estudios que intentan hacer ver asociaciones inexistentes desde el punto de vista científico.

6. EFICACIA DE LOS COLUTORIOS EN LA REDUCCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN OROFARÍNGEA POR EL SARS-COV-2

Una vez aclarada que la infectividad del SARS-CoV-2 depende de la posibilidad de entrar en las células mucosas orofaríngeas, usando la enzima proteica ACE2, que hace de la cavidad oral un lugar crítico para colonización, es fácil de deducir que las posibilidades de establecer un protocolo preventivo comenzarían evitando la transmisión desde dicha zona.

Lo primero que cabría plantearse ante el advenimiento de un cuadro infeccioso es si pudiera haber algún fármaco eficaz en la profilaxis y tratamiento del mismo. Estando localizada la puerta de la infección en la orofaringe, habría que valorar si alguno de los fármacos empleados como colutorios pudieran tener algún tipo de efecto sobre el virus. Se han llevado a cabo numerosos estudios a este respecto. En general, se sabe que el enjuague previo con colutorios, entre 30-120 segundos, es más eficaz reduciendo la contaminación por aerosoles, que con realizando ese mismo procedimiento con agua o simplemente no haciéndolo. Hay fundadas evidencias de que la **clorhexidina** (CHX) (0,12-0,2%) es eficaz en este propósito, sobre todo cuando se emplea con una aspiración de elevado volumen de evacuación, lo que parece eficaz como coadyuvante a la reducción del aerosol (Moh-Said *et al*. 2021). Aun así, a pesar de que tiene actividad virucida demostrada contra herpes simplex tipo 1 y 2, VIH tipo 1, citomegalovirus, virus influenza A, parainfluenza y hepatitis B, en la mayoría de protocolos no se recomienda específicamente para disminuir la carga viral oral del SARS-CoV-2, aunque otros autores demostraron que tras un enjuague con 1,5 ml de clorhexidina al 0,12% se suprimía la carga viral durante 2 horas (Raza-Kahn 2020). Otros protocolos recomiendan acondicionamiento faríngeo, con el uso de torundas, especialmente previo a cirugías (Somacarrera y Martin, en prensa). Nos obstante, en la actualidad, no existe evidencia científica suficiente sobre el uso de enjuagues bucales con CHX para la reducción de la carga microbiana relacionada con el SARS-CoV-2, aunque es cierto que constituiría un candidato interesante para futuros estudios clínicos que demuestren su eficacia en una potencial prevención de la transmisión del SARS-CoV-2 por aerosoles (Mateos-Moreno *et al*. 2021).

Entre los agentes antisépticos estudiados, el **cloruro de cetilpiridinio** (CPC) es el que, según la evidencia

científica disponible, ofrece resultados más alentadores. Es una sal de amonio cuaternario que tiene un amplio espectro de acción, bactericida y virucida, y suele estar disponible para uso oral en concentraciones de 0,02 a 0,07 %. Se considera un detergente y, se ha sido descrito su capacidad virucida frente al virus de la gripe. En estudios clínicos se ha podido observar que, usado en spray intraoral, reducía la incidencia de infecciones virales del tracto respiratorio superior, por lo que podría tener un efecto preventivo sobre la infección por virus de influenza, adenovirus, rinovirus, virus respiratorio sincitial y coronavirus, entre otros. Por lo tanto, se ha recomendado el uso de CPC al 0,05-0,1 % como enjuague del paciente antes del tratamiento oral para reducir la carga viral del SARS-CoV-2 (Mateos-Moreno *et al*. 2021). Por otro lado, se sabe que los colutorios con CPC reducen la infectividad de las variantes de SARS-CoV-2 *in vitro*. En este sentido, el CPC reduce la infectividad de SARS-CoV-2 inhibiendo el paso de la fusión viral con las células diana, por disrupción de la integridad de la envoltura viral. Los colutorios con CPC decrecen más de 1.000 veces la infectividad del virus, incluidas las variantes beta y alfa. Por tanto, el CPC debería tener especial interés en reducir SARS-CoV-2 en saliva y la infectividad (Muñoz-Basagoiti *et al*. 2021). En estudios *in vitro* se ha demostrado que el CPC en una concentración baja, de 50 µg/ml o menos, suprime la infectividad de la cepa Wuhan del SARS-CoV-2, incluidas las cepas alfa, beta y gamma. mostrando efectos virucidas incluso en la saliva. Bajas concentraciones de CPC podrían ejercer suficiente actividad antiviral contra el virus. El CPC se puede aplicar en una formulación comercial que pudiera ejercer su efecto durante mucho tiempo a bajas concentraciones. Podría ser que el efecto antiviral pudiera no deberse a la destrucción de la membrana lipídica sino a la desnaturalización de la proteína del SARS-CoV-2. Se ha informado que el CPC es eficaz contra la variante alfa del SARS-CoV-2. De cualquier forma, la duración del efecto antiviral del enjuague bucal que contiene CPC aún no está clara; aunque algunos estudios sugieren que una concentración baja es suficiente para mostrar un efecto antiviral. El uso de productos que contienen CPC podría conducir a una reducción del número de pacientes recién infectados (Takeda *et al*. 2022). Aún así, debería considerarse que, en un reciente ensayo clínico aleatorizado se evaluó la eficacia de tres enjuagues bucales comerciales, povidona iodada, CHX y CPC, en la reducción de la carga viral salival de SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 en comparación con el agua. La carga viral salival disminuyó con los colutorios a base de CPC y povidona iodada, y este efecto se mantuvo a las 6 h. Este resultado fue muy débil, ya que no se observaron diferencias significativas al comparar la carga viral de cada individuo con sus correspondientes niveles basales (Mateos-Moreno *et al*. 2021).

Otros estudios han hallado una reducción importante de la carga viral utilizando **povidona iodada** (Seveviratne *et al*. 2020). La povidona yodada no se debe utilizar en pacientes alérgicos o con problemas de tiroides, ni en mujeres embarazadas. La solución debe realizarse al 0,2 % y debemos tener en cuenta que suele comercializarse al 10 %, por lo que, para realizar la dilución, se recomienda 1 parte de povidona por 20 de agua (Somacarrera y Martin 2023). No obstante, hasta la fecha de redacción del presente capítulo, no se ha confirmado la eficacia de la povidona frente al SARS-CoV-2, tal y como reconoce la ADA (ADA 2020). Esta es probablemente una de las razones principales por las que los Centros para el Control de Enfermedades publicaron la Guía provisional de prevención y control de infecciones para entornos dentales durante el brote de COVID-19, que hace referencia a la versión de 2003 que indica la evidencia insuficiente sobre la eficacia de los enjuagues bucales antimicrobianos previos al procedimiento (Kohn *et al.* 2003). Pero dado que un enjuague con povidona iodada es una intervención sencilla, económica y prácticamente inocua, y existiendo estudios adecuados que justifican su eficacia podría plantearse su utilización hasta la realización de un ensayo clínico para confirmar su eficacia (Martínez-Lamas *et al*. 2022).

La solución de **peróxido de hidrógeno** al 1 % aunque presenta reconocida capacidad virucida, puede producir quemaduras en la mucosa si se usa de forma continuada y a una dilución demasiado concentrada (Somacarrera y Martin 2023), pero con una dilución correcta podría ser útil. Otros estudios atestiguan que el uso diario y regular del peróxido de hidrógeno al 1 % como enjuague bucal y gárgaras durante 1 minuto, y al 0,5 % para enjuague nasal durante 1 minuto brindan una protección eficaz contra la infección por el SARS-CoV-2. El peróxido de hidrógeno, por lo tanto, tendría cierto potencial de mitigar la pandemia, lo que supondría una solución mucho más simple y económica de lo que podría imaginarse. La evidencia clínica significativa del efecto protector del peróxido de hidrógeno contra la COVID-19, y considerando que también es bastante seguro, económico y fácilmente disponible, lo convierte en una profilaxis valiosa para los trabajadores sanitarios, los pacientes hospitalizados y todos los colectivos vulnerables frente al COVID-19, incluidos los pacientes de las clínicas dentales (Amoah *et al*. 2022). Pero debería considerarse que la mayor parte de los estudios controlados publicados son *in vitro*, y no se han realizado sobre pacientes. En un estudio *in vivo* sobre doce pacientes hospitalizados, usando peróxido de hidrógeno al 1 %, el enjuague bucal no produjo una reducción significativa de la carga viral intraoral.

Por lo que los autores indicaban que la recomendación de un enjuague de este producto antes de los procedimientos intraorales es cuestionable. En este contexto, se debe considerar el impacto de una «falsa sensación de seguridad» debido al enjuague bucal con peróxido de hidrógeno al 1 % en pacientes potencialmente infecciosos (Gottsauner *et al*. 2020, Mateos-Moreno *et al*. 2021).

Sabiendo que no hay evidencia científica suficiente referente a la eficacia de otros tipos de antisépticos en el manejo de la pandemia, y a la luz de la evidencia disponible en el momento de la redacción del presente capítulo, se puede atestiguar que existe suficiente evidencia *in vitro* que respalde el uso de antisépticos para reducir potencialmente la carga viral del SARS-CoV-2. Sin embargo, la evidencia *in vivo* para la mayoría de los antisépticos orales es limitada. Los estudios *in vivo* disponibles tienen tamaños de muestra extremadamente pequeños o no incluyen un grupo de placebo y arrojan resultados contradictorios o no concluyentes. Se necesitan ensayos clínicos aleatorios bien diseñados con un grupo de control para demostrar su eficacia clínica y son esenciales para aclarar si los antisépticos orales podrían ser útiles para reducir la carga viral del SARS-CoV-2 en las siguientes situaciones:

- Uso único antes del examen oral /procedimiento en pacientes asintomáticos/presintomáticos/sintomáticos.
- Uso a largo plazo en pacientes sintomáticos de la COVID-19 para reducir la patogenicidad de la enfermedad y el riesgo de transmisión.
- Uso a largo plazo a nivel poblacional como método complementario de higiene bucal, evaluando su utilidad en pacientes asintomáticos/presintomáticos de COVID-19 y su potencial contribución al control de la pandemia (Mateos-Moreno *et al*. 2021).

BIBLIOGRAFÍA

ADA Interim Guidance for Minimizing Risk of COVID-19 Transmission. https://www.ada.org/~/media/CPS/Files/COVID/ADA_COVID_Int_Guidance_Treat_Pts.pdf

AGYEMAN, A., CHIN, K., LANDERSDORFER, C., LIEW, D. & OFORI-ASENSO R. (2020), Smell and Taste Dysfunction in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. Mayo Clin Proceedings 95: 1621-1631.

AMOAH, A.G.B., SAGOE, K.W., QUAKYI, I.A., ..., KESSIE, G., AYETTEY, A.S. & KONOTEY-AHULU, F.I.D. (2022), Further Observations on Hydrogen Peroxide Antisepsis and COVID-19 Cases among Healthcare Workers and Inpatients. Journal of Hospital Infection 126: 103-108.

AMORIM DOS SANTOS, J., COSTA-NORMANDO, A.G., CARVALHO DA SILVA, R.L., ..., CEMBRANEL, A.C., SANTOS-SILVA, A.R. & SILVA-GUERRA, E.N. (2020), Oral Mucosal Lesions in a COVID-19 Patient: ¿New Signs or Secondary Manifestations? International Journal of Infectious Diseases 97: 326-328.

AMORIM DOS SANTOS, J., NORMANDO, A., CARVALHO DA SILVA, R., ACEVEDO, A., DE LUCA CANTO, G., SUGAYA, N. *et al.* (2021a), Oral Manifestations in Patients with COVID-19: A Living Systematic Review. Journal of Dental Research 100(2): 141-154.

AMORIM DOS SANTOS, J., NORMANDO, A., CARVALHO DA SILVA, R., ACEVEDO, A., DE LUCA CANTO, G., SUGAYA, N. *et al.* (2021b), Oral Manifestations in Patients with COVID-19: A 6-Month Update. Journal of Dental Research 100(12): 1321-1329.

ANAND, P.S., JADHAV, P., KAMATH, K.P., KUMAR, S.R., VIJAYALAXMI, S. & ANIL, S. (2022), A Case-Control Study on the Association between Periodontitis and Coronavirus Disease (COVID-19). Journal of Periodontology 93(4): 584-590.

ARAGONESES, J., SUÁREZ, A., ALGAR, J., RODRÍGUEZ, C., LÓPEZ-VALVERDE, N. & ARAGONESES, J.M. (2021), Oral Manifestations of COVID-19: Updated Systematic Review with Meta-Analysis. Frontiers in Medicine 8: 726-753.

BAIMA, G., MARRUGANTI, C., SANZ, M., AIMETTI, M. & ROMANDINI, M. (2022), Periodontitis and COVID-19: Biological Mechanisms and Meta-Analyses of Epidemiological Evidence. Journal of Dental Research 101(12): 1430-1440.

BHUJEL, N., ZAHEER, K. & SINGH, R. (2021), Oral Mucosal Lesions in Patients with COVID-19: A Systematic Review. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 59: 1024-1030.

BRANDÃO, T.B., GUEIROS, L.A., MELO, T.S., ..., PRADO, G.V.B., SANTOS-SILVA, A.R. & MIGLIORATI, C.A. (2021), Oral Lesions in Patients with SARS-CoV-2 Infection: Could the Oral Cavity Be a Target Organ? Oral Surgery Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology 131: e45-e51.

BULLÓN, B., MACHUCA, G. & BULLÓN, P. (2023), Aspectos periodontales en el tratamiento odontológico de pacientes con necesidades especiales. En: Machuca G, Bullón P, Castellanos L. *Tratamiento odontológico en pacientes frágiles y con necesidades especiales*. 4.ª edición. Ediciones Normon.

CAROD-ARTAL, F.J. (2021), Síndrome post-COVID-19: epidemiología, criterios diagnósticos y mecanismos patogénicos implicados. Revista de Neurología 72: 384.

CASTLE, J. (2020), 1.3 Association Is Not the Same as Causation. Informed Health Choices. Key Concepts

for Assessing Treatment Claims. Students 4 Best Evidence (S4BE). https://exme.cochrane.org/blog/

CHARY, M.A., BARBUTO, A.F., IZADMEHR, S., HAYES, B.D. & BURNS, M.M. (2020), COVID-19: Therapeutics and Their Toxicities. Journal of Medical Toxicology 16: 284-294.

CUEVAS-GONZALEZ, M., ESPINOSA-CRISTÓBAL, L., DONOHUE-CORNEJO, A., TOVAR-CARRILLO, K., SAUCEDO-ACUÑA, R., GARCÍA-CALDERÓN, A. *et al.* (2021), COVID-19 and Its Manifestations in the Oral Cavity. Medicine 100: e28327.

ERBAŞ, G., BOTSALI, A., ERDEN, N., ARI, C., TAŞKIN, B., ALPER, S. *et al.* (2021), COVID-19-Related Oral Mucosa Lesions among Confirmed SARS-CoV-2 Patients: A Systematic Review. International Journal of Dermatology 61: 20-32.

FERNANDES MATUCK, B., DOLHNIKOFF, M., MAIA, G.V.A., ..., SALDIVA, P.H.D.N., BRAZ-SILVA, P.H. & DA SILVA, L.F.F. (2020), Periodontal Tissues Are Targets for SARS-CoV-2: A Post-Mortem Study. Journal of Oral Microbiology 13: 1848135.

GOTTSAUNER, M.J., MICHAELIDES, I., SCHMIDT, B., ..., BOHR, C., VIELSMEIER, V. & CIEPLIK, F. (2020), A Prospective Clinical Pilot Study on the Effects of a Hydrogen Peroxide Mouthrinse on the Intraoral Viral Load of SARS-CoV-2. Clinical Oral Investigation 24: 3707-3713.

GUARDADO-LUEVANOS, I., BOLOGNA-MOLINA, R., ZEPEDA-NUÑO, J.S., ..., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R., PÉREZ-PÉREZ, M. & LÓPEZ-VERDÍN, S. (2022), Self-Reported Periodontal Disease and Its Association with SARS-CoV-2 Infection. International Journal of Environmental Research and Public Health 19: 10306.

GUPTA, S., MOHINDRA, R., CHAUHAN, P.K., ..., SURI, V., BHALLA, A. & SINGH, M.P. (2021), SARS-CoV-2 Detection in Gingival Crevicular Fluid. Journal of Dental Research 100: 187-193.

GUPTA, S., MOHINDRA, R., SINGLA, M., ..., BHALLA, A., SORSA, T. & RÄISÄNEN, I. (2022), The Clinical Association between Peridontitis and COVID-19. Clinical Oral Investigation 26: 1361-1374.

JEPSEN, S., CATON, J.G., ALBANDAR, J.M., ..., SUSIN, C., WEST, N.X. & YAMAZAKI, K. (2018), Periodontal Manifestations of Systemic Diseases and Developmental and Acquired Conditions: Consensus Report of Workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. Journal of Periodontology 89 Suppl 1: S237-S248.

KHAN, F.R., KAZMI, S.M.R., IQBAL, N.T., IQBAL, J., ALI S.T., ABBAS, S.A. (2020), A Quadruple Blind, Randomised Controlled Trial of Gargling Agents in Reducing Intraoral Viral Load among Hospitalised COVID-19 Patients: A Structured Summary of a Study Protocol for a Randomised Controlled Trial. Trials 21: 785.

KOHN, W.G., COLLINS, A. S., CLEVELAND, J.L., HARTE, J.A., EKLUND, K.J. & MALVITZ, D.M. (2003), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings–2003. MMWR – Recommendations and Reports 52(RR-17): 1-61.

MACHUCA, G. (2022), La odontología en pacientes con necesidades especiales como disciplina vertebradora entre la ciencia médica y la estomatología. Discurso de recepción como académico de número de la Academia de Ciencias Odontológicas de España. Madrid.

MAHMOUD, M.M., ABUOHASHISH, H.M., KHAIRY, D.A., BUGSHAN, A.S., KHAN, A.M. & MOOTHEDATH, M.M. (2021), Pathogenesis of Dysgeusia in COVID-19 Patients: A Scoping Review. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 25: 1114-1134.

MARTÍN CARRERAS-PRESAS, C., AMARO SÁNCHEZ, J., LÓPEZ-SÁNCHEZ, A.F., JANÉ-SALAS, E. & SOMACARRERA PÉREZ, M.L. (2021), Oral Vesiculobullous Lesions Associated with SARS-CoV-2 Infection. Oral Dis. 27 Suppl 3: 710-712.

MARTÍNEZ LAMAS, L., DIZ DIOS, P., PÉREZ RODRÍGUEZ, M.T., ..., FERNANDEZ FEIJOO, J., DINIZ FREITAS, M. & LIMERES POSSE, J. (2022), Is Povidone Iodine Mouthwash Effective against SARS-CoV-2? First In Vivo Tests. Oral Diseases 28 Suppl 1: 908-911.

MATEOS-MORENO, M.V., MIRA, A., AUSINA-MÁRQUEZ, V. & FERRER, M.D. (2021), Oral Antiseptics against Coronavirus: In-Vitro and Clinical Evidence. Journal of Hospital Infection 113: 30-43.

MOHD-SAID, S., MOHD-DOM, T.N., SUHAIMI, N., RANI, H. & McGRATH, C. (2021), Effectiveness of Pre-Procedural Mouth Rinses in Reducing Aerosol Contamination during Periodontal Prophylaxis: A Systematic Review. Frontiers in Medicine (Lausanne). 8: 600769.

MUÑOZ-BASAGOITI, J., PEREZ-ZSOLT, D., LEÓN, R., ..., BLANCO, J., GISPERT, J., CLOTET, B. & IZQUIERDO-USEROS, N., Mouthwashes with CPC Reduce the Infectivity of SARS-CoV-2 Variants In Vitro. Journal of Dental Research 100: 1265-1272.

NEMETH-KOHANSZKY, M., MATUS-ABÁSOLO, C. & CARRASCO-SOTO, R. (2020), Manifestaciones orales de la infección por COVID-19. International Journal of Odontostomatology 14: 555-560.

OFFENBACHER, S., KATZ, V., FERTIK, G., COLLINS, J., BOYD, D., MAYNOR, G., MCKAIG, R. & BECK, J. (1996), Periodontal Infection as a Possible Risk Factor

for Preterm Low Birth Weight. Journal of Periodontology 67(10 Suppl): 1103-1113.

ORILISI, G., MASCITTI, M., TOGNI, L., MONTERUBBIANESI, R., TOSCO, V., VITIELLO, F. *et al.* (2021), Oral Manifestations of COVID-19 in Hospitalized Patients: A Systematic Review. International Journal of Environmental Research Public Health 18: 12511.

PANDA, M., DASH, S., BEHERA, B. & SIL, A. (2021), Dermatological Manifestations Associated with COVID-19 Infection. Indian Journal of Dermatology 66: 237-245.

PARRA-SANABRIA, E., BERMÚDEZ-BERMÚDEZ, M., PEÑA-VEGA, C. & RUEDA-JIMÉNEZ, A. (2020), Manifestaciones orales y maxilofaciales asociadas a la COVID-19. Revisión de la literatura. Acta Odontológica Colombiana 10: 60-80.

PASTRIAN-SOTO, G. (2020), Presencia y expresión del receptor ACE2 (Target de SARS-CoV-2) en tejidos humanos y cavidad oral. Posibles rutas de infección en órganos orales. International Journal of Odontostomatology 14: 501-507.

SAKAGUCHI, W., KUBOTA, N., SHIMIZU, T., ..., SUGIMOTO, M., YAKEISHI, M. & TSUKINOKI, K. (2020), Evidence of SARS-CoV-2 Entry Molecules in the Oral Cavity. International Journal of Molecular Sciences 21: 6000.

SALAS-OROZCO, M., NIÑO-MARTÍNEZ, N., MARTÍNEZ-CASTAÑÓN, G., PATIÑO-MARÍN, N., SÁMANO-VALENCIA, C., DIPP-VELÁZQUEZ, F. *et al.,* Presence of SARS-CoV-2 and Its Entry Factors in Oral Tissues and Cells: A Systematic Review. Medicina 57: 523.

SANTOS, R., DA SILVA, M., DO MONTE SILVA, M., BARBOSA, D., GOMES, A., GALINDO, L. *et al.* (2021), On Set and Duration of Symptoms of Loss of Smell/Taste in Patients with COVID-19: A Systematic Review. American Journal of Otolaryngology 42: 102889.

SARODE, G.S., SARODE, S.C., GADBAIL, A.R., GONDIVKAR, S., SHARMA, N.K. & PATIL, S. (2021), Are Oral Manifestations Related to SARS-CoV-2 Mediated Hemolysis and Anemia? Medical Hypotheses 146: 110413.

SENEVIRATNE, C.J., BALAN, P., KO, K.K.K, ..., OON, L., GOH, B.T. & SIM, X.Y.J. (2021), Efficacy of Commercial Mouth-Rinses on SARS-CoV-2 Viral Load in Saliva: Randomized Control Trial in Singapore. Infection 49: 305-311.

SINGH, H., KAUR, H., SINGH, K. & SEN, C. (2021), Cutaneous Manifestations of COVID-19: A Systematic Review. Advances in Wound Care 10: 51-80.

SOMACARRERA, M.L. & MARTÍN, C. (2023), Asistencia odontológica a pacientes con infección por VIH. Repercusiones odontológicas de la pandemia por COVID-19. En: Machuca G, Bullón P, Castellanos L. *Tratamiento odontológico en pacientes frágiles y con necesidades especiales*. 4.ª Edición. Ediciones Normon.

TAKEDA, R., SAWA, H., SASAKI, M., ..., SANO, H., KITAGAWA, Y. & HIDA, K. (2022), Antiviral Effect of Cetylpyridinium Chloride in Mouthwash on SARS-CoV-2. Scientific Reports 12: 14050.

UZÊDA-E-SILVA, V.D., DE SÁ, I.B., MARTINS, J., PEDREIRA, N., VIEIRA, V.P.S. & SILVA, B.H.M. (2021), Oral Lesions Associated with COVID-19: A Systematic Review. Stomatologija 23: 3-8.

VARGAS, F. (2013), Concepto de causalidad en Medicina. En: Moreno L. *Epidemiología Clínica.* 3.ª edición. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana Editores.

Capítulo XXII

Tratamiento farmacológico del COVID-19: estado actual y estrategias futuras para el tratamiento de la enfermedad

Sofía Miñano Meneres[1], Ángel Vilches Arenas[2] y Francisco Javier Miñano Sánchez[3]

[1] *Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada;*

[2] *Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Sevilla;*

[3] *Departamento de Farmacología, Pediatría y Radiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) se originó en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei (China) en diciembre de 2019 en pacientes que presentaban una neumonía de etiología desconocida (Li *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2020).

El COVID-19 es causado por un nuevo coronavirus, denominado síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (anteriormente conocido provisionalmente como nuevo coronavirus 2019 [2019-nCoV]) (Xu *et al.* 2020). Desde su detección, el SARS-CoV-2 ha tenido un efecto devastador en la población mundial, provocando millones de muertes en todo el mundo, convirtiéndose en la crisis sanitaria mundial más importante desde la pandemia de la Gripe de 1918.

A principios de enero de 2020 se reveló su gran tamaño (aproximadamente 30 mil nucleótidos) con respecto a otros virus del tipo ARN como, por ejemplo, los 10 mil nucleótidos del SIDA o los 19 mil del Ébola. En paralelo se determinó que el genoma del SARS-CoV-2 presenta una similitud genómica con otros coronavirus de origen zoonótico como el SARS-CoV (79 %) y el MERS-CoV (50 %), causantes del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) (Lu *et al.* 2020; Zhou *et al.* 2020). A pesar de este alto grado de similitud, la tasa de mortalidad del SARS-CoV-2 (2-4 %) es mucho menor que las tasas de mortalidad del SARS-CoV-1 (11 %) y MERS-CoV (35 %) (Song *et al.* 2019). En comparación con el MERS-CoV y el SARS-CoV, el SARS-CoV-2 es extraordinariamente eficaz en la transmisión entre humanos, probablemente debido a su período de incubación (7 días) y el tiempo que transcurre desde la exposición al agente hasta el momento en que la persona puede transmitir la enfermedad (1-2 días), lo que le proporciona una gran transmisibilidad presintomática (Park *et al.* 2020).

El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la enfermedad del coronavirus 2019 como emergencia de salud pública de interés internacional.

El 11 de marzo de 2020, debido a los niveles alarmantes de propagación y gravedad, la OMS la declaró pandemia, originando una frenética carrera para secuenciar este virus, promovida por el rápido desarrollo tecnológico y descripción de millones de secuencias del genoma desde la publicación del primer genoma de SARS-CoV-2 a mediados de enero de 2020 (Wu *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2020). La rápida secuenciación del genoma del SARS-CoV-2 ha permitido su diagnóstico, seguimiento epidemiológico y desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas.

El SARS-CoV-2 pertenece a la familia Coronaviridae, género Betacoronavirus, entre los que también se encuentran el SARS-CoV y el MERS-CoV (Wu *et al.* 2020). Como coronavirus beta típico, el SARS-CoV-2 tiene una forma de forma esférica, y al igual que otros virus de ARN, es propenso a la evolución genética mientras se adapta a sus nuevos huéspedes humanos con el desarrollo de mutaciones a lo largo del tiempo, dando lugar a la aparición de múltiples variantes que pueden tener características diferentes en comparación con sus cepas

ancestrales (Giovanetti *et al.* 2021). La evolución genética del SARS-CoV-2 fue mínima durante la fase inicial de la pandemia, con la aparición de una variante dominante a nivel mundial denominada D614G, que se asoció a una mayor transmisibilidad, pero sin aumentar la gravedad de la enfermedad de su cepa ancestral (Korber *et al.* 2020). A medida que avanzaba la pandemia, la diversidad genómica del SARS-CoV-2 aumentó significativamente y surgieron varias variantes preocupantes (VOC) y variantes de interés (VOI) que pueden estar asociadas a una mayor transmisibilidad, provocar una enfermedad más grave y/o escapar significativamente de la inmunidad mediada por anticuerpos, reduciendo así la eficacia de las vacunas disponibles y los tratamientos con antivirales (Chaqroun *et al.* 2021; Krause *et al.* 2021; Planas *et al.* 2021, 2022; Zhou *et al.* 2021).

El 5 de mayo de 2023, el Comité de Emergencias del COVID-19 declaró el fin de la emergencia internacional tras considerar la evolución y los datos actuales de la pandemia (WHO 2023). En estos cuatro años, y aunque se han administrado hasta el 13 de diciembre de 2023 más de 174.000 millones de dosis de vacunas en todo el mundo, se han confirmado cerca de 773 millones de diagnósticos y 7 millones de muertes (https://covid19.who.int).

Tras la aparición del COVID-19, se han realizaron muchos estudios. Como resultado, se diseñaron vacunas e identificaron moléculas de origen natural, compuestos sintéticos y anticuerpos monoclonales con potenciales terapéuticos significativos para luchar contra el SARS-CoV-2. No obstante, el SARS-CoV-2 sigue propagándose y evolucionando debido a variantes víricas emergentes que eluden cada vez más la inmunidad adquirida mediante vacunación, infección natural o ambas, lo que supone una amenaza persistente de extraordinaria importancia sanitaria y social (Carabelli *et al.* 2023).

La aparición de nuevas subvariantes Ómicron XBB ha reducido drásticamente la eficacia de las vacunas monovalentes y bivalentes de ARNm contra las subvariantes de Ómicron previamente dominantes, como XBB.1.5 y EG.5.1 (Patel *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023c). Recientemente han aparecido varias subvariantes de SARS-CoV-2 Ómicron, que están ganando terreno en distintas partes del mundo. En particular, la mitad de las nuevas infecciones en Asia se atribuyen a la subvariante HK.3, mientras que la subvariante HV.1 constituye más del 20 % de los nuevos casos en Norteamérica. En Europa se están expandiendo las subvariantes JD.1.1, BA.2.86 y JN.1, cada una de las cuales representa más del 3 % en la actualidad (Wang *et al.* 2023d).

Recientemente se ha demostrado que la administración de una vacuna de ARNm monovalente actualizada (XBB.1.5 MV) a individuos no infectados aumenta significativamente los anticuerpos séricos de neutralización del virus no solo contra XBB.1.5 (27,0 veces) y el actualmente dominante EG.5.1 (27,6 veces), sino también contra virus emergentes clave como HV.1, HK.3, JD.1.1 y JN.1 (13,3-27,4 veces) (Wang *et al.* 2023d). Estos hallazgos han llevado a la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) a autorizar las vacunas monovalentes basadas en la subvariante XBB.1.5 para personas mayores de 6 meses, a partir del otoño de 2023 (FDA 2023).

La rápida expansión de los conocimientos sobre la virología del SARS-CoV-2 ha proporcionado un número importante de posibles objetivos farmacológicos y desarrollo de alternativas terapéuticas frente a la infección por SARS-CoV-2, habiéndose logrado progresos sustanciales en la terapéutica de pacientes con COVID-19 leve o moderado (Gandhi *et al.* 2022). Hasta ahora, a fecha de 21 de diciembre del 2023, la FDA ha autorizado y aprobado varios medicamentos antivirales que son utilizados por vía oral o intravenosa para tratar casos leves o moderados de COVID-19 en personas con mayor riesgo de enfermarse gravemente, al objeto de impedir que el virus se multiplique en el organismo y ayudar a evitar la forma grave de la enfermedad o la muerte.

Esta revisión ofrece una perspectiva actual del progreso habido hasta el momento en el desarrollo de terapias farmacológicas para el COVID-19, con énfasis en los compuestos antivirales e inmunomoduladores que son de alta prioridad para el desarrollo clínico contra este virus y sus nuevas variantes del SARS-CoV-2.

1. EPIDEMIOLOGÍA

La infección por el SARS-CoV-2, denominada COVID-19 (por sus siglas en inglés COronaVIrus Disease 19), fue detectada inicialmente en Wuhan, China, en diciembre de 2019 en un grupo de pacientes con neumonía grave (Huang *et al.* 2020a). Aunque no está claro su origen, los estudios filogenéticos revisados hasta la fecha apuntan a que muy probablemente el virus provenga de murciélagos y que de allí haya pasado al ser humano a través de mutaciones o recombinaciones sufridas en un hospedador intermediario, probablemente algún animal vivo del mercado de Wuhan (donde aparte de pescado y marisco se vendían otros animales vivos). Se planteó que este animal pudiera ser el pangolín bien de forma directa o indirecta, a través de otra especie, sin que se haya llegado a una conclusión definitiva (Paules *et al.* 2020).

El COVID-19 arrasó China continental y se extendió rápidamente por todo el mundo, con una tasa de letalidad del 5,9 % (WHO 2019). El agente causante se aisló y denominó provisionalmente nuevo coronavirus 2019 (2019-nCoV) (Wu *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2020). El

30 de enero de 2020, la OMS declaró el brote de 2019-nCoV como la sexta emergencia de salud pública de preocupación internacional, después del H1N1 (2009). la poliomielitis (2014), el ébola en África Occidental (2014), el Zika (2016) y el ébola en la República Democrática del Congo (2019). El 11 de febrero de 2020, la OMS anunció un nuevo nombre para la enfermedad epidémica causada por el 2019-nCoV: enfermedad por coronavirus (COVID-19). Ese mismo día, el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus, cambió el nombre del anteriormente denominado 2019-nCoV por el de coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo-2 (SARS-CoV-2) (Coronaviridae Study Group 2020; Walker *et al.* 2021).

El COVID-19 originado por el SARS-CoV-2 fue declarada pandemia mundial por la OMS el 11 de marzo de 2020. Desde entonces, esta situación se ha visto agravada por la continua aparición de VOC del SARS-CoV-2 y se observa un crecimiento de contagios por lo que muchos países continúan soportando múltiples olas de brotes de esta enfermedad viral a pesar de la vacunación. Otro problema de Salud Pública en esta pandemia, son los individuos asintomáticos que pueden seguir transmitiendo el virus siempre que su carga viral sea lo suficientemente alta.

Según la reciente actualización epidemiológica de la OMS, hasta el 11 de diciembre de 2021 se habían identificado cinco COV del SARS-CoV-2 desde el inicio de la pandemia: Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2), y Ómicron (B.1.1.529). En particular, la variante B.1.1.529 del SARS-CoV-2 (Ómicron) se notificó por primera vez en Botsuana y en Sudáfrica en noviembre de 2021 y fue clasificada como variante preocupante por la OMS el 26 de noviembre de 2021 (Karim 2021). A mediados de diciembre de 2021, la variante Ómicron se detectó en más de 30 países y a finales de enero de 2022 era el linaje dominante en todo el mundo y se ha convertido en una grave preocupación debido al rápido aumento del número de pacientes infectados en todo el mundo a pesar de la extraordinaria velocidad del desarrollo de vacunas contra el COVID-19 y los continuos esfuerzos de vacunación masiva (Wang *et al.* 2022).

Desde la declaración de la conclusión de la fase de emergencia de la pandemia de COVID-19 el 5 de mayo de 2023 (WHO 2023), el SARS-CoV-2 sigue propagándose y evolucionando. Las variantes víricas emergentes eluden cada vez más la inmunidad adquirida mediante vacunación, infección natural o ambas, lo que supone una amenaza persistente para la salud pública. La aparición de nuevas subvariantes Ómicron XBB ha reducido drásticamente la eficacia de las vacunas monovalentes y bivalentes de ARNm contra el SARS-CoV-2 (Wang *et al.* 2023c).

La variante Ómicron presenta una mayor capacidad de escape inmune que variantes previas, incremento en transmisibilidad y menor gravedad de los casos. Se ha expandido rápidamente a nivel global. Actualmente predominante en todo el mundo, incluyendo España.

Ómicron comprende 5 linajes (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5) y los sublinajes derivados de estos (entre los que se encuentra XBB). BA.1 fue el linaje mayoritario durante la primera fase de expansión. BA.2, que presenta numerosas diferencias respecto a BA.1, fue aumentando hasta convertirse en el linaje predominante a nivel global desde marzo hasta junio de 2022. El linaje XBB.1.5 se convirtió en el dominante a nivel global en febrero de 2023 (en marzo en España). Este linaje presenta una mutación que le confiere la capacidad de evasión de la respuesta a los anticuerpos que ya presentaban XBB o XBB.1 y una mayor capacidad de transmisión respecto a XBB y XBB.1.

A fecha de 21 de noviembre de 2023, según la OMS, las variantes de interés (VOI) actualmente en circulación son la XBB.1.5, XBB.1.16, EG.5, BA.2.86, mientras que las variantes bajo vigilancia (VUM) son DV.7, XBB, XBB.1.9.1, XBB.1.9.2 (https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/).

El 3 de julio de 2023, el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES) actualizó la situación epidemiológica de las variantes de SARS-CoV-2 en España. El porcentaje de Ómicron se situaba en el 100%, siendo en su mayoría pertenecientes al linaje recombinante XBB.1.5 y derivados de este (47,7%), que son los que están mostrando una mayor expansión a nivel global. Los linajes derivados de XBB.1.9 suponen el 29,2%, los derivados de XBB.1.16, el 6,2%, y el resto de los derivados de XBB, el 9,2% (CCAES 2023).

La capacidad de la variante Ómicron para evadir las respuestas inmunitarias humorales, ya sean inducidas por la infección o por la vacunación, o la aparición de variantes Ómicron más transmisibles, es de esperar que provoque más reinfecciones y nuevas infecciones, a pesar de informes previos indicando una mayor proporción de infecciones por Ómicron que conducen a resultados más leves de la enfermedad (Wolter *et al.* 2022).

A nivel mundial, a fecha de 17 de diciembre de 2023, se han notificado a la OMS 772.838.745 casos confirmados de COVID-19, incluyendo 6.988.679 fallecidos. En España, desde el 3 de enero de 2020 hasta el 19 de diciembre de 2023, se han notificado a la OMS 13.980.340 casos confirmados de COVID-19 y 121.852 fallecidos (https://covid19.who.int/). Dados los limitados recursos iniciales y existentes en algunos países para las pruebas y el tratamiento del COVID-19, es probable que más personas de las documentadas se hayan infectado con el virus y hayan sucumbido a la enfermedad.

2. EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

EL SARS-CoV-2 provoca un cuadro que oscila desde episodios leves pseudogripales a graves e incluso potencialmente mortales debido, sobre todo, a la insuficiencia respiratoria aguda. La sintomatología del COVID-19 varía entre los pacientes y el tratamiento debe adaptarse a los síntomas específicos, ya que hay muchos puntos críticos de la progresión de la enfermedad que pueden ser objeto de tratamiento. El desarrollo y la progresión del COVID-19 pueden considerarse como un proceso de varias etapas evolutivas que comienzan con la exposición al virus (fig. 1).

La fase temprana estaría caracterizada por una elevada carga vírica. Es probable que, poco después de la infección, la carga viral aumente rápidamente a partir del segundo día en el tracto respiratorio superior. Se ha demostrado que la proteína ACE2 (enzima convertidora de angiotensina-2) es la puerta de entrada que utiliza el virus SARS-CoV-2 para introducirse en las células humanas, infectarlas y comenzar su diseminación por el organismo. Esta proteína se expresa con mayor densidad, en la mucosa oral y nasal y en el epitelio del pulmón, lo que proporciona posibles vías de entrada para el coronavirus al pulmón (Hou *et al.* 2020). Esto parece significar una mayor probabilidad de infección inicial en las vías respiratorias superiores. Por ello, los virus encontrados en las gotas de la mucosa nasal son la fuente probable de transmisión a las personas en contacto estrecho.

Por otra parte, no está claro si el tracto respiratorio inferior sigue el ejemplo o tiene un retraso, como tampoco lo está cuál es la intensidad de la carga viral en el tracto inferior. Los hallazgos recientes en pacientes con condiciones críticas sugieren que el retraso en el tracto inferior es mínimo. Además, la carga viral del tracto inferior parece persistir mucho más tiempo, incluso si las muestras del tracto superior son negativas en los mismos individuos (Huang *et al.* 2020b). En cualquier caso, se espera que los síntomas aparezcan alrededor del quinto día de la infección. La carga viral en el tracto superior debería alcanzar su punto máximo alrededor del décimo día desde la infección (He *et al.* 2020; Zou *et al.* 2020). Por lo tanto, según la carga viral, los sujetos presintomáticos pueden transmitir el virus durante 2-4 días antes de la prueba diagnóstica. Es probable que los medicamentos antivirales y los tratamientos basados en mAbs dirigidos al SARS-CoV-2 sean más eficaces durante esta fase de replicación viral.

La fase posterior de la enfermedad está caracterizada por un estado hiperinflamatorio inducido por la liberación de citoquinas (tormenta de citoquinas) y la activación del sistema de coagulación que induce un estado protrombótico. Los fármacos antiinflamatorios, como los corticosteroides, las terapias inmunomoduladoras o una combinación de estas terapias pueden ayudar a combatir este estado hiperinflamatorio.

3. SARS-COV-2: VIROLOGÍA Y DIANAS FARMACOLÓGICAS

El SARS-CoV-2 es un virus ARN monocatenario de la familia de los coronavirus. Como todos los coronavirus, la entrada en las células del SARS-CoV-2 depende de su proteína con estructura de espiga (S), responsable de la adhesión a las células del huésped y de la fusión de las membranas virales y celulares, al intervenir en dos eventos esenciales: la unión al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) por la región amino-terminal y la fusión de las membranas virales y celulares a través de la región carboxilo-terminal (Matheson y Lechner 2020). Tras la unión al receptor, la partícula del virus utiliza los receptores de la célula huésped y las endosomas para entrar en las células. Una serina proteasa transmembrana tipo 2 (TMPRSS2) del huésped, facilita la entrada en la célula a través de la proteína S. Una vez dentro de la célula, se sintetizan poliproteínas virales que codifican para el complejo replicasa-transcriptasa. El virus sintetiza entonces ARN a través de su ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), conduciendo a la síntesis de proteínas estructurales que completan el ensamblaje y la liberación de partículas virales. Estas etapas del ciclo de vida viral proporcionan objetivos potenciales para el tratamiento farmacológico del SARS-CoV-2 (fig. 2).

4. ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS FRENTE AL SARS-COV-2

Durante los últimos cuatro años y tras la aparición de COVID-19 se han realizado numerosos estudios. Como resultado, varias moléculas naturales, compuestos sintéticos y anticuerpos monoclonales con potencial terapéutico contra el SARS-CoV-2.

Las estrategias terapéuticas actuales se centran en la inhibición viral mediante fármacos antivirales y en la obstaculización de la exuberante respuesta inmunitaria del huésped mediante fármacos inmunomoduladores. Estos dos enfoques pueden desplegarse en secuencia o en el transcurso de la infección viral y el desarrollo de la enfermedad. En primer lugar, la estrategia antiviral pretende reducir el riesgo de progresión y gravedad de la enfermedad, cuando la replicación vírica activa es aún prevalente. Es probable que los antivirales solo sean eficaces en la fase inicial de la infección, poco después de la exposición y antes de la hospitalización. En segundo

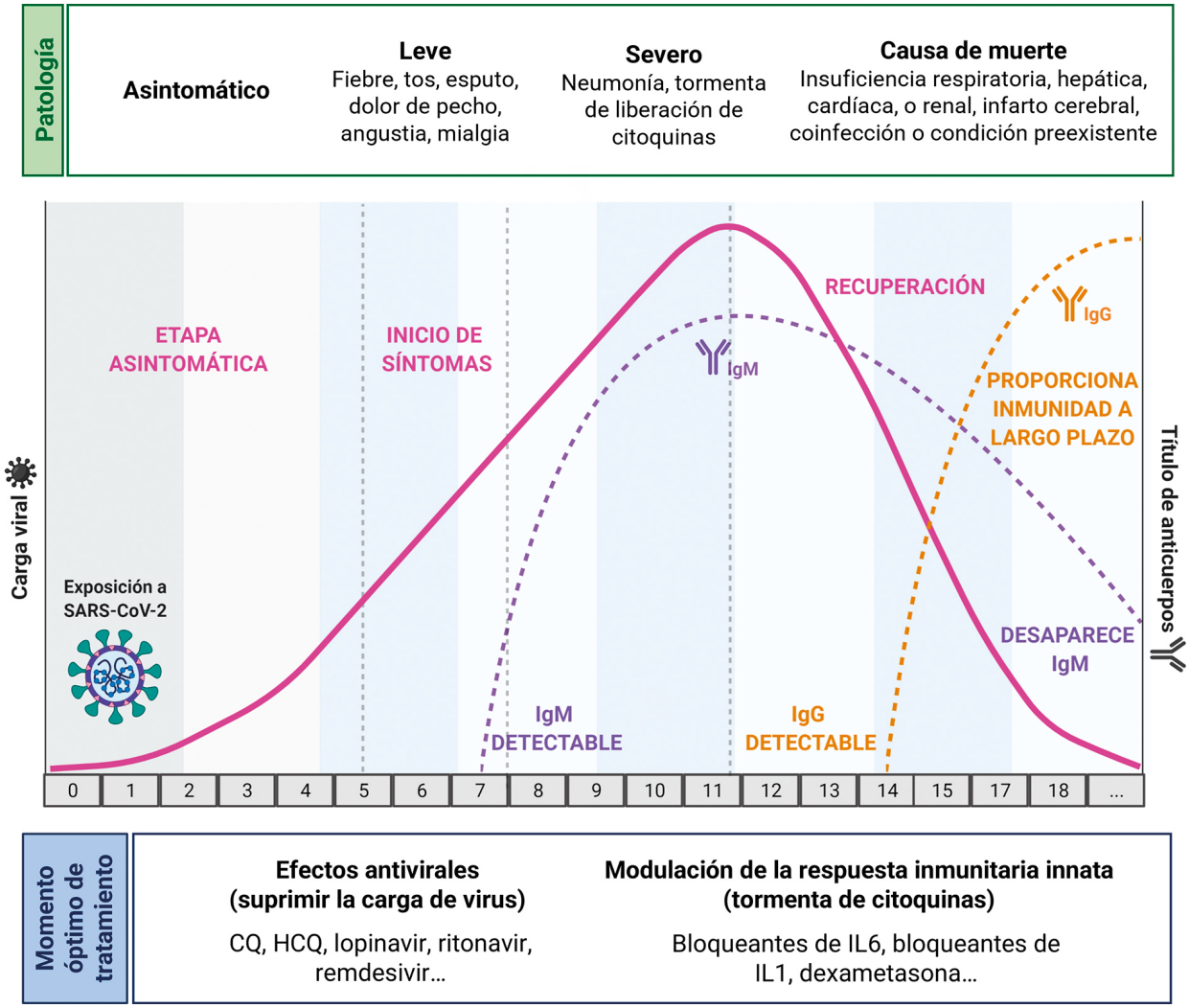


Figura 1. Evolución temporal de la infección por el SARS-CoV-2 con la carga viral, la patología, la respuesta del huésped y la consiguiente posibilidad de seroconversión. Los fármacos y las terapias pueden dividirse en términos generales en aquellos que tienen como objetivo frenar la replicación viral (efectos antivirales) y que se aconseja administrar en las primeras etapas de la infección para aplanar la curva viral, y aquellos que tienen como objetivo modular la respuesta del huésped (efectos inmunomoduladores) que se aconsejan como remedio para la tormenta de citoquinas en los pacientes gravemente enfermos (adaptado de «Evolución temporal de la infección por COVID-19 y de la positividad en las pruebas», por Biorender.com [2023]. Obtenido de https://app.biorender.com/biorender-templates)

lugar, si se pierde la ventana temporal antiviral (fase temprana), puede considerarse una terapia inmunomoduladora para reducir los efectos nocivos de una respuesta hiperinmune (fase posterior) debida a la «tormenta de citoquinas» y evitar el daño tisular y el fallo de múltiples órganos (ver fig. 1). Sin embargo, hay que tener en cuenta que no todos los pacientes con COVID-19 reúnen los requisitos para recibir alguno de estos fármacos, dado que la eficacia de estos tratamientos es específica, basada principalmente en el curso y gravedad de la enfermedad o en determinados factores de riesgo (Perazzolo *et al.* 2021).

Las variantes actuales del virus del COVID-19 tienden a causar un cuadro menos grave de la enfermedad, mientras que los niveles de inmunidad son más elevados como consecuencia de la vacunación, lo que ha reducido el riesgo de enfermedad grave y fallecimiento para la mayoría de los pacientes. Como consecuencia de ello, la OMS ha actualizado sus directrices sobre los tratamientos contra el COVID-19, que incluyen recomendaciones más actualizadas para pacientes que no presentan un cuadro grave (https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1). La nueva categoría de «riesgo moderado» incluye ahora a las personas que antes se consideraban de alto riesgo, como las personas de edad y/o las personas con afecciones crónicas, discapacidad y comorbilidades de las enfermedades crónicas.

La presente revisión pretende ofrecer una perspectiva del progreso habido hasta el momento en el desarrollo de estrategias farmacológicas para el COVID-19, con énfasis

en las terapias antivirales e inmunomoduladoras actuales frente al SARS-CoV-2 y sus nuevas variantes, en base a su eficacia y de acuerdo con la dinámica de la carga viral, y el curso y gravedad de la enfermedad.

5. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA EL COVID-19

El ciclo de vida de los coronavirus consta de una serie de pasos que comienza con la unión viral a una célula diana y culmina en la replicación viral. En el caso del SARS-CoV-2 esta unión se realiza entre la proteína S del virus y el receptor de ACE2. El objetivo de los diferentes tratamientos que se están estudiando para el tratamiento del COVID-19 se basa en intentar romper los «eslabones de la cadena» del ciclo de vida viral para prevenir la propagación de la infección dentro de las células de los pacientes.

5.1. Fármacos antivirales

De acuerdo con su mecanismo de acción los fármacos antivirales los podemos clasificar en: (1) compuestos que inhiben las enzimas del SARS-CoV-2, incluidas su polimerasa y proteasas; (2) compuestos que inhiben la entrada del virus, incluidos los anticuerpos monoclonales; y (3) fármacos de nueva creación que inhiben los procesos del huésped necesarios para la replicación del SARS-CoV-2 (ver fig. 2).

5.1.1. Inhibidores de la polimerasa

Las ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRp) catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre los nucleósidos trifosfatos de una manera que está marcada por el ARN. Las RdRp están muy conservadas en sus características estructurales y funcionales, incluso entre diversos virus de ARN pertenecientes a diferentes familias (Peersen 2019). Los inhibidores de la polimerasa análogos a los nucleósidos son los compuestos antivirales más comunes que comprenden una pluralidad de todos los antivirales autorizados.

— **Remdesivir.** Es un profármaco análogo del nucleósido C de adenina 1'-ciano-sustituido GS-441524. Su forma activa, trifosfato de remdesivir, actúa como un análogo de los nucleósidos e inhibe la RdRp de los coronavirus, lo que provoca la terminación de la síntesis de ARN (Kokic *et al.* 2021). El remdesivir tiene una actividad de amplio espectro contra múltiples virus de ARN e inhibe el SARS-CoV, el MERS-CoV y el SARS-CoV-2 (Wang Y *et al.* 2020). Inhibe los coronavirus en múltiples tipos de células, incluidas las células epiteliales primarias de las vías respiratorias humanas (Sheahan *et al.* 2020).

Basándose en los resultados de un ensayo clínico aleatorio controlado (ACTT-1) en 1062 pacientes hospitalizados que demostró que el remdesivir era superior al placebo para acortar el tiempo de recuperación en adultos hospitalizados con COVID-19 de leve a grave, la FDA autorizó el uso clínico de remdesivir para emergencias en adultos y pacientes pediátricos (mayores de 12 años y con un peso mínimo de 40 kilogramos) en pacientes hospitalizados con COVID-19 (Beigel *et al.* 2020).

Sin embargo, el ensayo SOLIDARITY, patrocinado por la OMS, publicó resultados preliminares contradictorios. En 2750 pacientes asignados al azar a un ciclo de 10 días de remdesivir, no se observaron diferencias significativas en la mortalidad de los pacientes hospitalizados en comparación con el tratamiento estándar. Tampoco hubo diferencias significativas en el tiempo hasta el alta o el deterioro clínico que requería ventilación mecánica (Pan *et al.* 2021). Además, el remdesivir no se asoció a reducciones de los niveles de carga viral en las vías respiratorias superiores o inferiores en el único estudio que examinó este resultado (Wang *et al.* 2020b). La OMS emitió una recomendación en 2020 contra el uso de remdesivir en pacientes hospitalizados.

Remdesivir también se ha estudiado en pacientes no hospitalizados con COVID-19 leve a moderado que tenían un alto riesgo de progresar a enfermedad grave, no detectándose diferencias entre pacientes tratados con remdesivir durante 5 y 10 días frente a placebo (Spinner *et al.* 2020). Sin embargo, un ensayo aleatorio doble ciego controlado con placebo informó de un riesgo de hospitalización o muerte un 87 % menor que el placebo cuando los pacientes de riesgo no hospitalizados con COVID-19 fueron tratados con un ciclo de 3 días de remdesivir intravenoso (Gottlieb *et al.* 2022).

Actualmente el remdesivir está aprobado por la FDA para su uso en pacientes hospitalizados con COVID-19 y en pacientes no hospitalizados con COVID-19 leve a moderado que tienen un alto riesgo de progresión de la enfermedad. No hay datos disponibles sobre la eficacia del remdesivir contra las nuevas variantes de SARS-CoV-2; sin embargo, se espera que remdesivir sea activo contra la variante Ómicron, aunque los datos *in vitro* e *in vivo* son actualmente limitados (Vangeel *et al.* 2022).

— **Favipiravir.** El favipiravir es un profármaco antiviral de amplio espectro, análogo de los nucleósidos, que se dirige a la ARN polimerasa viral y la inhibe de forma competitiva que ya se ha utilizado en el tratamiento de la gripe (Furuta *et al.* 2013). En algunos países, las directrices de tratamiento del COVID-19

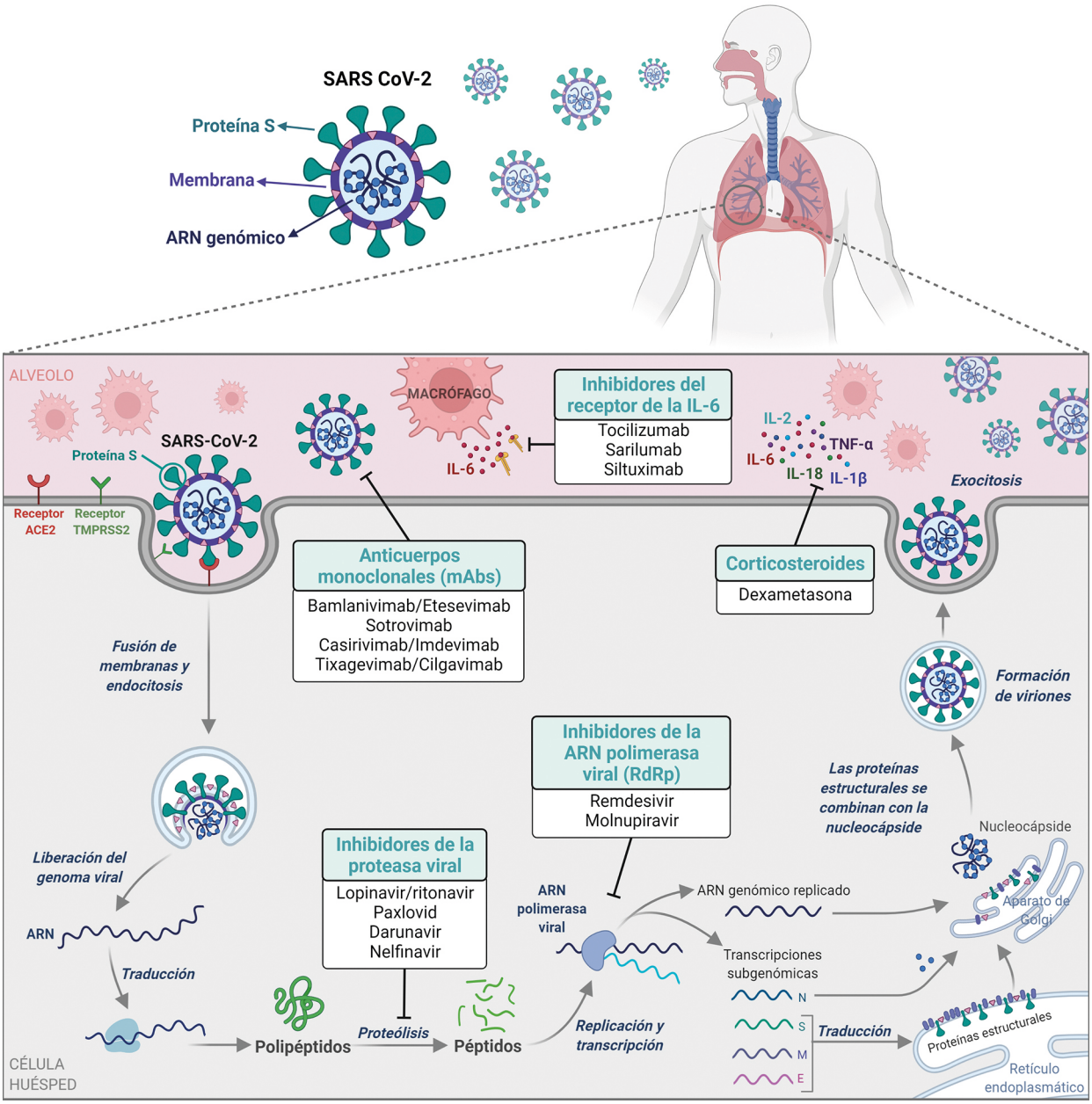


Figura 2. Representación esquemática de la respuesta del sistema inmunitario del huésped inducida por el virus SARS-CoV-2 y el procesamiento viral dentro de las células infectadas. La replicación viral se produce principalmente en el citoplasma de los epitelios pulmonares. El virus infecta inicialmente las células entrando por fusión de membranas o endocitosis. El genoma viral se libera y se somete a procesos de traducción para producir proteínas virales estructurales y no estructurales. Las proteínas virales importantes en el ciclo de vida son las proteasas y las polimerasas. Estas proteínas permiten la replicación viral para desarrollar viriones maduros. Los viriones salen de la célula huésped por exocitosis y lisis celular. La progenie se libera para infectar otras células. Se indican las dianas propuestas de determinados fármacos antivirales e inmunomoduladores existentes aprobados por la FDA. ACE2, enzima convertidora de angiotensina 2; proteína S, proteína de espiga; y TMPRSS2, serina proteasa transmembrana de tipo 2 (adaptado de «Ciclo de replicación del coronavirus», por Biorender.com [2023]. Obtenido de https://app.biorender.com/biorender-templates)

sugirieron favipiravir como un medicamento antiviral que ha demostrado ser seguro y eficaz *in vitro*, por lo que se sigue utilizando para el tratamiento del SARS-CoV-2; sin embargo, aún no hay consenso sobre su eficacia en el tratamiento del COVID-19. Basándose en los datos y la literatura publicados, el favipiravir no presenta un efecto beneficioso significativo sobre la mortalidad entre los pacientes con COVID-19 de leve a moderado. Tampoco hay pruebas de que favipiravir disminuya la tasa de mortalidad o el uso de ventilación mecánica entre los pacientes moderados y graves con COVID-19 (Özlüşen *et al.* 2021). Por todo ello, este fármaco y dado que no cuenta aún con estudios que incluyan a pacientes moderados y

graves con tamaños de muestra adecuados que describan la eficacia de favipiravir en el COVID-19, este fármaco debe ser considerado entre los fármacos experimentales.

— **Molnupiravir.** Es un profármaco antiviral oral, que se convierte en ribonucleósido β-D-N4-hidroxicitidina (NHC) en el plasma con rapidez. El NHC se distribuye en las células y la enzima quinasa lo transforma en ribonucleósido trifosfato (NHC-TP), que es farmacológicamente activo; la RdRp lo incorpora al genoma viral, lo que conduce a una acumulación de errores en todo el genoma viral que, en última instancia, hace que el virus no sea infeccioso y no pueda replicarse (Malone y Campbell 2021).

Inicialmente desarrollado para el tratamiento de la gripe, se reutilizó como antiviral para el COVID-19 porque inhibe la replicación del SARS-CoV-2 con una potencia *in vitro* similar a la del Remdesivir. Ha demostrado tener una actividad antiviral de amplio espectro contra múltiples virus, incluidos el MERS-CoV, el SARS-CoV y el SARS-CoV-2 (Sheahan *et al.* 2020; Fischer *et al.* 2022).

Respecto a su eficacia frente a variantes de preocupación del SARS-CoV-2, el molnupiravir demostró actividad en ensayos *in vivo* contra las variantes alfa y beta, y en ensayos *in vitro* contra las variantes delta y Ómicron. Actualmente no se dispone de datos sobre la actividad *in vivo* contra las variantes delta u Ómicron (Abdelnabi *et al.* 2021; Prince *et al.* 2021; Vangeel *et al.* 2022). Tampoco se dispone de datos suficientes para determinar la posible resistencia del SARS-CoV-2 al molnupiravir. Aunque parece no haber una base molecular para la pérdida de actividad, existe una incertidumbre residual sobre si una mayor tasa de replicación o transmisión puede afectar la eficacia del fármaco.

Basándose en el metaanálisis de estudios de fase 1-3 disponibles, se observó que el molnupiravir reducía de forma significativa la hospitalización y la muerte en pacientes con COVID-19 leve (Singh *et al.* 2021). Con estos primeros hallazgos, se realizó el estudio MOVe-OUT, ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, fase 3, multicéntrico que incluyó 1433 adultos con COVID-19 leve a moderado (según criterios de severidad de la OMS), no hospitalizados ni vacunados, en los primeros 5 días del inicio de la enfermedad. Los resultados indicaron que el tratamiento precoz con molnupiravir reducía el riesgo de hospitalización o muerte en adultos de riesgo no vacunados con COVID-19 leve o moderado (Jayk Bernal *et al.* 2022).

Por otra parte, se ha descrito que molnupiravir, debido a que su mecanismo de acción se basa precisamente en introducir mutaciones en el virus, podría causar mutaciones en el ADN humano o acelerar el desarrollo de nuevas variantes virales. Los estudios *in vitro* y con animales han sugerido la posibilidad de carcinogénesis. Sin embargo, con base en los resultados de los estudios de genotoxicidad disponibles a la fecha y la duración del tratamiento de 5 días, se ha establecido que el riesgo de genotoxicidad del molnupiravir es bajo (Painter *et al.* 2021).

También existe una incertidumbre residual con respecto a otros daños a largo plazo; la eficacia del fármaco contra las variantes, en particular las que tienen mayores tasas de replicación o transmisión; la posibilidad de una aparición selectiva para las mutaciones resistentes a nivel individual, con el potencial de propagarse a nivel poblacional; y la aparición de nuevas variantes relacionadas con la mutagénesis aleatoria derivada del mecanismo de acción del molnupiravir.

Dada la situación de emergencia y estudios de metaanálisis disponibles (Singh *et al.* 2021), el 23 de diciembre de 2021, la FDA otorgó una autorización de emergencia (EUA) para el tratamiento del COVID-19 de leve a moderado en mayores de 18 años que presentaban alto riesgo de progresión a COVID-19 grave, incluida hospitalización o muerte, y para quienes las opciones alternativas de tratamiento para el COVID-19 aprobadas no eran accesibles o clínicamente apropiadas (https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-oral-antiviral-treatment-covid-19-certain).

A finales de febrero de 2023, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) rechazó la autorización de comercialización de molnupiravir, fundamentada en que la evidencia adjuntada por el laboratorio fabricante no fue suficiente para concluir que molnupiravir reduce el riesgo de hospitalización, muerte, disminución de los días de enfermedad o tiempo de recuperación en pacientes con alto riesgo de enfermedad grave. Asimismo, agregó que no era posible identificar un perfil de pacientes con mayor probabilidad de beneficio clínico con este tratamiento. No obstante, molnupiravir persiste con una EUA en pacientes ambulatorios adultos con COVID-19 leve o moderado que presentan mayor riesgo de hospitalización, estando aprobado o autorizado para su uso en más de 25 países, incluyendo Australia, Japón, Estados Unidos, Reino Unido y China para el tratamiento de ciertos pacientes adultos con COVID-19 no grave con mayor riesgo de hospitalización.

Por otra parte, no se ha establecido la seguridad, eficacia y rentabilidad del molnupiravir en pacientes

vacunados de la comunidad con mayor riesgo de morbilidad y mortalidad por COVID-19. En este sentido, los resultados del estudio PANORAMIC, un ensayo controlado aleatorizado, abierto y prospectivo, indican que el uso de molnupiravir para tratar la infección confirmada por SARS-CoV-2 en adultos vacunados con mayor riesgo de sufrir un desenlace adverso cuando la variante circulante dominante era la Ómicron no redujo los ingresos hospitalarios ni las muertes, ambos ya de por sí muy poco frecuentes, pero sí el tiempo hasta la recuperación, y la detección y carga virales (Butler *et al.* 2023).

En resumen, el balance riesgo-beneficio de molnupiravir para el tratamiento del COVID-19 presenta incertidumbres. Las evidencias analizadas no sustentan el uso en pacientes ambulatorios y hospitalizados. El beneficio clínico sobre la mortalidad y hospitalización no es claro, existiendo evidencias que muestran que no hay diferencias significativas comparado con el tratamiento estándar. Se agrega la escasa evidencia sobre el riesgo de uso de molnupiravir, dado que su perfil de efectos adversos está poco caracterizado, sobre todo entre las personas de mayor riesgo se encuentran las que no están vacunadas, las de mayor edad y las que padecen inmunodepresión o enfermedades crónicas como la diabetes. El molnupiravir está autorizado solo mientras dure la declaración de que existen circunstancias que justifiquen la autorización del uso de emergencia. No está incluido como primera recomendación en ninguna guía de tratamiento vigente.

5.1.2. Inhibidores de la proteasa

La principal proteasa del SARS-CoV-2 (Mpro o M^{PRO}, también conocida como 3CLpro o proteasa nsp5), se considera un prometedor objetivo farmacológico, ya que sus propiedades son únicas y distintas de las proteasas humanas. La inhibición de las proteasas del SARS-CoV-2 es clave para reducir la replicación y la carga viral. Dado que la secuencia y la estructura de esta proteasa son similares a las de otros CoV, ello ha facilitado la búsqueda de inhibidores y compuestos para esta diana farmacológica que forman parte del desarrollo de estrategias y terapias farmacológicas actuales.

— **Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir).** Paxlovid se compone de Nirmatrelvir, un potente inhibidor de la Mpro, principal proteasa del SARS-CoV-2, que desempeña un papel esencial en la replicación viral al escindir las poliproteínas virales (Pillaiyar *et al.* 2016), y de Ritonavir, que no tiene actividad contra el SARS-CoV-2 por sí solo, pero es un fuerte inhibidor del citocromo P450 3A4 (CYP3A4), principal sistema enzimático del metabolismo y pérdida de actividad de Nirmatrelvir, permitiendo que este alcance niveles terapéuticos y permanezca en el organismo durante más tiempo (Owen *et al.* 2021).

Un análisis inicial de los datos de un ensayo en fase 2-3 que incluía a 1219 pacientes, demostró que el riesgo de ingreso hospitalario relacionado con el COVID-19 o de mortalidad por todas las causas era un 89 % menor en el grupo de Paxlovid en comparación con el placebo cuando se iniciaba en los tres días siguientes al inicio de los síntomas (Mahase *et al.* 2021). Esta eficacia es mayor que la eficacia notificada para molnupiravir. El 22 de diciembre de 2021, la FDA emitió una Autorización de Uso de Emergencia autorizando el uso oral de Paxlovid para el tratamiento del COVID-19 de leve a moderado en adultos y pacientes pediátricos (a partir de 12 años y con un peso mínimo de 40 kg) con resultados positivos en las pruebas virales directas de SARS-CoV-2, y que presentan un alto riesgo de progresión a COVID-19 grave, incluyendo la hospitalización o la muerte. El tratamiento debe iniciarse lo antes posible y dentro de los 5 días posteriores al inicio de los síntomas.

Los datos que respaldan esta autorización para Paxlovid proceden del estudio EPIC-HR, un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo que estudia Paxlovid para el tratamiento de adultos sintomáticos no hospitalizados con un diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 confirmado por el laboratorio (Hammond *et al.* 2022). Los pacientes eran adultos de 18 años o más con un factor de riesgo preespecificado para la progresión a la enfermedad grave o tenían 60 años o más, independientemente de las condiciones médicas crónicas preespecificadas. Los pacientes incluidos en el estudio no habían recibido una vacuna contra el COVID-19 y no habían sido infectados previamente con el COVID-19. El resultado principal medido en el ensayo fue la proporción de personas que fueron hospitalizadas debido a COVID-19 o que murieron por cualquier causa durante 28 días de seguimiento. Paxlovid redujo significativamente la proporción de personas con hospitalización relacionada con el COVID-19 o muerte por cualquier causa en un 88 % en comparación con el placebo entre los pacientes tratados dentro de los cinco días siguientes al inicio de los síntomas y que no recibieron el tratamiento con mAbs contra el COVID-19. En este análisis, 1.039 pacientes habían recibido Paxlovid y 1.046 pacientes habían recibido placebo y, entre estos pacientes, el 0,8 % que recibió Paxlovid fue hospitalizado o murió durante los 28 días de seguimiento, en comparación con el

6 % de los pacientes que recibieron placebo. Entre los posibles efectos secundarios de Paxlovid se encuentran la alteración del sentido del gusto, la diarrea, la hipertensión arterial y los dolores musculares y daños hepáticos. Se sigue evaluando la seguridad y la eficacia de Paxlovid para el tratamiento del COVID-19.

El uso de Paxlovid al mismo tiempo que algunos otros medicamentos puede dar lugar a interacciones farmacológicas potencialmente importantes. Dado que Paxlovid actúa, en parte, inhibiendo un grupo de enzimas que metabolizan ciertos fármacos, Paxlovid está contraindicado con fármacos que dependen en gran medida de esas enzimas para su metabolismo y para los que las concentraciones elevadas de ciertos fármacos se asocian con reacciones graves y/o potencialmente mortales. Paxlovid también está contraindicado con fármacos que inducen fuertemente esas mismas enzimas, y que puede conducir a un metabolismo más rápido de nirmatrelvir o ritonavir, ya que las concentraciones reducidas de nirmatrelvir o ritonavir pueden asociarse a una posible pérdida de la respuesta virológica y al desarrollo de una resistencia viral.

— Otros inhibidores de la proteasa viral. Actualmente, aunque existen pocos ensayos clínicos para evaluar la seguridad y la eficacia del uso de medicamentos antirretrovirales en el tratamiento del COVID-19, fármacos antirretrovirales utilizados para el tratamiento de la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que inhiben de forma potente y selectiva la proteasa viral, como el darunavir y el nelfinavir, están en proceso de evaluación para determinar la posible actividad antiviral contra el SARS-CoV-2. El nelfinavir ha demostrado *in vitro* ser un potente inhibidor de la fusión celular causada por la glicoproteína de la espiga (S) del SARS-CoV-2 (Musarrat *et al.* 2020). Un ensayo multicéntrico, aleatorizado y controlado para evaluar la eficacia y la seguridad del nelfinavir administrado por vía oral en pacientes con COVID-19 asintomático o levemente sintomático aporta pruebas de que el nelfinavir, a pesar de sus efectos antivirales sobre el SARS-CoV-2 *in vitro*, no debe recomendarse para el tratamiento de pacientes con COVID-19 que no presenten síntomas o estos sean leves (Miyazaki *et al.* 2023). En general, mientras se buscan inhibidores más potentes de la proteasa del VIH y más específicos de la proteasa del SARS-CoV-2, de momento, la combinación nirmatrelvir/ritonavir puede ser la mejor opción disponible para inhibir la actividad de la proteasa del SARS-CoV-2, y evitar la propagación del virus en los primeros momentos tras la aparición de los síntomas del SARS-CoV-2.

5.1.3. Anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-SARS-CoV-2

Los mAbs son una forma de inmunidad pasiva que ha permitido superar algunas de las limitaciones y de los inconvenientes asociados al uso del plasma de pacientes convalecientes de COVID-19; entre esas ventajas se encuentran el hecho de que los títulos de anticuerpos en el plasma pueden ser insuficientes, la posibilidad de dar una dosis precisa de un anticuerpo cuya seguridad y eficacia haya sido evaluada, el uso de moléculas dirigidas a epítopos específicos, una mayor posibilidad de conservar eficacia a pesar de las mutaciones del virus y tal vez evitar los posibles riesgos asociados con el uso de hemoderivados.

Los mAbs neutralizantes son aislados comúnmente de las células B de memoria de personas recuperadas del SARS-CoV-2, de ratones transgénicos inmunizados y de bibliotecas de visualización combinatoria de proteínas (Raybould *et al.* 2021). Estos agentes se dirigen a la glicoproteína de espiga (S) del SARS-CoV-2 que consta de dos subunidades funcionales: S1, que incluye el dominio de unión al receptor (*Receptor Binding Domain, RBD*) y el dominio N-terminal (NTD) y que media en la fijación al huésped, y la subunidad S2 responsable de la fusión del virus y las membranas celulares. La aparición de las variantes preocupantes (VOC) del SARS-CoV-2 que presentan mutaciones y deleciones en el RBD, el NTD y la subunidad S2 ha puesto de manifiesto la necesidad de una utilización más específica de estas terapias avanzadas. En este sentido, se han desarrollado mAbs específicos para el SARS-CoV-2 dirigidos a un único epítopo vírico. Sin embargo, su uso requiere precaución, ya que estudios *in vitro* (Greaney *et al.* 2021) y clínicos han demostrado un rápido desarrollo de mutaciones que confieren resistencia tras exposición a varios mAbs contra el SARS-CoV-2 (Weinreich *et al.* 2021). Estas observaciones han impulsado el desarrollo de cócteles de mAbs que se dirigen simultáneamente a múltiples epítopos del SARS-CoV-2.

En la actualidad, se han desarrollado varios mAbs neutralizantes del SARS-CoV-2 que han recibido la autorización de uso de emergencia por parte de las agencias reguladoras, y otros anticuerpos están avanzando en los ensayos clínicos de fase 3. Las combinaciones de banlanivimab con etesevimab y de casirivimab con imdevimab han sido autorizadas para la prevención en las personas de alto riesgo de desarrollar enfermedad seria que han estado expuestas al virus; ambas combinaciones, junto con la monoterapia a base de sotrovimab, están también autorizadas para el tratamiento de los pacientes ambulatorios, con pocos días de evolución de la enfermedad y que tengan factores de alto riesgo; por último, la

combinación de tixagevimab con cilgavimab fue recientemente autorizada para la profilaxis pre-exposición en las personas de alto riesgo que no pueden ser vacunadas por alergia severa o en quienes no pueda conseguirse una adecuada protección con la vacuna debido a la presencia de alguna condición de compromiso inmunológico (Gupta *et al.* 2021).

Todos los mAbs se administran por vía parenteral. En el caso de la combinación de casirivimab con imdevimab se ha detectado que en los pacientes ambulatorios la administración por la vía subcutánea mostró reducciones similares de la carga viral en comparación con la vía intravenosa. En general, la vida media de los anticuerpos IgG es de unos 30 días o más. Estos mAbs se han registrado para la profilaxis y/o tratamiento de la enfermedad de COVID-19 de leve a moderado con riesgo de evolucionar a una enfermedad grave (tabla 1).

— **Bamlanivimab.** La entrada en la célula del SARS-CoV-2 depende de la unión de las proteínas virales de espiga (S) a los receptores celulares y del cebado de la proteína S por las proteasas de la célula huésped. La proteína S del SARS-CoV-2 se une al receptor de ACE2 a través de su RBD, utilizando la serina proteasa TMPRSS2 como activador de la entrada (Hoffman *et al.* 2020). El bamlanivimab es un anticuerpo monoclonal IgG1K neutralizante que se une al RBD de la proteína S, impidiendo la unión del SARS-CoV-2 al receptor ACE2. Banlanivimab ha demostrado neutralizar el SARS-CoV-2 y reducir la replicación viral en primates no humanos (Jones *et al.* 2020). En función de estos hallazgos, la FDA autorizó la monoterapia con bamlanivimab en noviembre de 2020.

El ensayo clínico BLAZE-I asignó a 452 pacientes ambulatorios la recepción de tres dosis diferentes de bamlanivimab o de placebo (Chen *et al.* 2021) (tabla 2). Los pacientes que recibieron la dosis intermedia presentaron un descenso acelerado de la carga viral en el día 11 y menores tasas de hospitalización. Este análisis provisional también estableció el perfil de seguridad del bamlanivimab, que fue similar al del grupo de placebo en las tres dosis (Gottlieb *et al.* 2021). Un ensayo controlado aleatorio en el que participaron 299 residentes y personal de una residencia estadounidense observó una frecuencia significativamente menor de COVID-19 sintomático en aquellos que recibieron solo bamlanivimab (Cohen *et al.* 2021). Este ensayo respaldó la creencia de que bamlanivimab, y potencialmente otros anticuerpos monoclonales, pueden reducir e incluso prevenir otros en la reducción de los síntomas e incluso prevenir precozmente el COVID-19 en pacientes clínicamente vulnerables. Sin embargo, y debido a la carencia de investigaciones acerca de la eficacia preventiva con los patrones actuales de cepas víricas, el 25 de marzo de 2021 se dejó de distribuir el bamlanivimab solo, debido a la creciente aparición de variantes del coronavirus y dudosa por sí sola (Liu *et al.* 2021). Estos resultados sugieren que el bamlanivimab podría tener una mayor eficacia en las primeras fases de la enfermedad asociado a otros anticuerpos.

— **Bamlanivimab y etesevimab.** Bamlanivimab y etesevimab son anticuerpos neutralizantes IgG1 que se unen a epítopos distintos pero superpuestos dentro del receptor dominio de unión de la proteína S del SARS-CoV-2. Experimentos *in vitro* revelaron que etesevimab se une a un epítopo diferente al de bamlanivimab y neutraliza las variantes resistentes con mutaciones en el epítopo unido por bamlanivimab.

El ensayo clínico designado con el acrónimo ACTIV-3 (*Accelerating COVID-19 Therapeutic Interventions and Vaccines phase 3*) se diseñó para ensayar anticuerpos monoclonales o combinaciones de estos. Este ensayo demostró que la administración conjunta de remdesivir y bamlanivimab puso de manifiesto que Bamlanivimab, cuando se coadministra con remdesivir, carece de eficacia entre pacientes

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales autorizados como uso de emergencia para prevenir o tratar COVID-19

Fármaco	Vía de administración	Dosis	Indicaciones
Bamlanivimab + Etesevimab	Intravenosa	Bamlanivimab 700 mg Etesevimab 1400 mg	Profilaxis después de la exposición Tratamiento
Sotrovimab	Intravenosa	500 mg	Tratamiento
Casirivimab + Imdevimab	Intravenosa o subcutánea	Casirivimab 600 mg Imdevimab 600 mg	Profilaxis después de la exposición Tratamiento
Tixagevimab + Cilgavimab	Intramuscular	Tixagevimab 150 mg Cilgavimab 150 mg	Profilaxis antes de la exposición

hospitalizados que tenían COVID-19 sin fallo orgánico final (Lundgren *et al.* 2021). Este estudio fue interrumpido debido a problemas de seguridad. En la fase 2 del ensayo BLAZE-1, el bamlanivimab/etesevimab se asoció a una reducción significativa de la carga viral del SARS-CoV-2 en comparación con el placebo (Gottlieb *et al.* 2021) (tabla 2). Los datos de la parte de la fase 3 de BLAZE-1 indican que la terapia reduce el riesgo de hospitalización y muerte en un 87 % (Dougan *et al.* 2021).

Inicialmente, en febrero de 2021, se autorizó el EUA de la terapia combinada de bamlanivimab con etesevimab para el tratamiento del COVID-19, de leve a moderado, en adultos y pacientes pediátricos (a partir de 12 años y con un peso mínimo de 40 kg) con resultados positivos en las pruebas virales directas de SARS-CoV-2, y que presentan un alto riesgo de progresión a COVID-19 grave, y/o hospitalización. El 25 de junio de 2021 se paró la distribución de bamlanivimab y etesevimab debido a que esta terapia combinada no era activa frente a las variantes del coronavirus Beta (B.1.351); y Gamma (P.1). Finalmente, el 24 de enero de 2022 y tras revisión de los estudios realizados, la FDA limitó el uso de bamlanivimab y etesevimab administrados conjuntamente para el tratamiento del COVID-19 o como profilaxis posexposición del COVID-19 al objeto de excluir regiones geográficas teniendo en cuenta las variantes susceptibles y no susceptibles a bamlanivimab y etesevimab. Bamlanivimab y etesevimab se encuentran en fase de investigación porque todavía carecemos de información sobre la seguridad o la eficacia del uso conjunto de ambos para el tratamiento o la prevención del COVID-19.

— **Sotrovimab.** Es un anticuerpo monoclonal disponible bajo autorización de uso de emergencia para el tratamiento de pacientes con riesgo de progresión del COVID-19 a enfermedad grave. Identificado a partir de las células B de memoria de un individuo que se infectó con el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) en 2003. A diferencia de otros anticuerpos monoclonales (Focosi y Maggi 2021), sotrovimab se dirige a un epítopo altamente conservado en la proteína de espiga (RBD) del SARS-CoV-2 en una región que no compite con la unión de la ACE2 (Liu *et al.* 2021). Además de neutralizar el SARS-CoV-2, sotrovimab ha demostrado funciones efectoras *in vitro* que pueden contribuir a la eliminación viral mediada por el sistema inmunitario (Pinto *et al.* 2020). Los datos también sugieren que el sotrovimab puede impedir la fusión célula-célula (es decir, la formación de sincitios), a diferencia de otros anticuerpos dirigidos al dominio de unión al receptor (Lempp *et al.* 2021). Sotrovimab mantiene su actividad contra todas las variantes del virus del SARS-CoV-2 actualmente probadas y de interés, según la definición de la OMS, además de otras, entre las que se incluyen Delta (B.1.617.2), Delta Plus (AY.1 o AY.2), Mu (B.1.621) y Ómicron (B.1.1.529). Sotrovimab presenta una potente actividad *in vitro* e *in vivo* contra el SARS-CoV-2 (Cathcart *et al.* 2021). Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la resistencia inducida *in vitro* y en clínica debido a la adquisición de mutaciones en el epítopo diana de sotrovimab en posiciones específicas de aminoácidos de la proteína S que le confieren una elevada resistencia tanto *in vitro* (reducción de 100 a 295 veces en estudios de neutralización) como en participantes del ensayo COMET-ICE, lo que ha impulsado el desarrollo de cócteles de mAbs que se dirigen simultáneamente a múltiples epítopos del SARS-CoV-2.

Los resultados del ensayo COMET-ICE, multicéntrico, doble ciego y controlado con placebo, que evaluaron la eficacia clínica y la seguridad de sotrovimab, demostraron que una dosis de sotrovimab (500 mg) reducía el riesgo de hospitalización o muerte en un 85 % en pacientes de alto riesgo no hospitalizados con COVID-19 leve a moderado, en comparación con el placebo (Gupta *et al.* 2021) (tabla 2). Sotrovimab está autorizado para su uso en virtud de una EUA para el tratamiento del COVID-19 de leve a moderado en adultos y pacientes pediátricos (de 12 años o más que pesen al menos 40 kg) con resultados positivos en las pruebas virales directas de SARS-CoV-2, y que tengan un alto riesgo de progresión a COVID-19 grave, incluyendo la hospitalización o la muerte (Cameroni *et al.* 2022).

No obstante, debido al rápido desarrollo de mutaciones en el gen de la espiga asociadas con un alto nivel de resistencia a sotrovimab *in vitro* y que el SARS-CoV-2 puede persistir viable en pacientes hasta 24 días después del tratamiento con sotrovimab (Rockett *et al.* 2022), sería aconsejable realizar vigilancia genómica de los pacientes que reciben mAbs neutralizantes del SARS-CoV-2 para minimizar el riesgo tanto de fracaso del tratamiento como de transmisión de variantes de SARS-CoV-2 potencialmente resistentes en entornos de atención médica y la comunidad.

— **REGN-COV2 (Casirivimab e Imdevimab):** REGN-COV2 es un cóctel de anticuerpos que contiene dos anticuerpos IgG1 monoclonales (casirivimab e imdevimab) que se dirigen a aminoácidos específicos del RBD de la espiga del SARS-CoV-2 y que ha demostrado disminuir la carga viral *in vivo*, previniendo las secuelas patológicas inducidas por el virus cuando se administra de forma profiláctica o terapéutica en

Tabla 2. Resumen de los principales estudios clínicos con anticuerpos monoclonales contra COVID-19 en los pacientes ambulatorios

Estudio	Fármacos	Características del estudio	Principales resultados
BLAZE-1	Bamlanivimab, administrado en 3 dosis distintas *vs.* placebo	Aleatorizado, de fase 2 452 pacientes con COVID-19 leve o moderado de diagnóstico reciente	Reducción de la carga viral Reducción de las hospitalizaciones o las visitas a emergencias con bamlanivimab en comparación con placebo: 1,6 % *vs.* 6,3 %
BLAZE-1 extensión	Bamlanivimab + etesevimab *vs.* bamlanivimab solo *vs.* placebo	Aleatorizado, de fase 3 1035 pacientes, con ≤ 3 días de diagnóstico de COVID-19 leve o moderado, pero con alto riesgo de progresión a enfermedad severa	Reducción de las hospitalizaciones o la muerte con la terapia combinada en comparación con placebo: 2,1 % *vs.* 7,0 %
COMET-ICE	Sotrovimab *vs.* placebo	Aleatorizado, de fase 3 583 pacientes con ≤ 5 días de síntomas de COVID-19 leve o moderado, pero con alto riesgo de progresión a enfermedad severa	Reducción de las hospitalizaciones o la muerte con sotrovimab en comparación con placebo: 1 % *vs.* 7 %
REGEN-COV2	Casirivimab + imdevimab *vs.* placebo	Aleatorizado, de fase 3 4180 pacientes con ≤ 3 días de diagnóstico de COVID-19 leve o moderado, con factor de riesgo de progresión a enfermedad severa	Reducción de las hospitalizaciones o la muerte con casirivimab + imdevimab en comparación con placebo: 1,2 % *vs.* 4,1 %
PROVENT	Tixagevimab + cilgavimab *vs.* placebo	Aleatorizado de fase 3 5172 personas no vacunadas, de alto riesgo de progresión a enfermedad severa	Reducción del desarrollo de enfermedad sintomática con tixagevimab + cilgavimab en comparación con placebo: 0,2 % *vs* 1,0 %

primates no humanos (Baum *et al.* 2020). Estudios *in vitro* han demostrado que REGN-COV2 es activo frente a las dos variantes de SARS-CoV-2 que son motivo de preocupación (variantes B.1.1.7; B.1.351) (Wang *et al.* 2021). Los resultados de un análisis provisional de 275 pacientes de un ensayo doble ciego en curso en el que participaron pacientes no hospitalizados con COVID-19 que fueron asignados al azar para recibir placebo o 2,4 g de REGN-COV2 (casirivimab 1.200 mg e imdevimab 1.200 mg) o bien 8 g de REGN-COV2 (casirivimab 2.400 mg e imdevimab 2.400 mg) informaron de que el cóctel de anticuerpos REGN-COV2 redujo la carga viral en comparación con el placebo. Este análisis provisional también estableció el perfil de seguridad de este cóctel de anticuerpos, similar al del grupo de placebo (Weinreich *et al.* 2021) (tabla 2).

Un estudio de fase 3 en curso, los participantes asintomáticos expuestos a un miembro de la familia infectado por el COVID-19 fueron asignados al azar a placebo o a 1200 mg de casirivimab/imdevimab (600 mg de cada anticuerpo administrados por vía subcutánea) en las 96 horas siguientes a que el miembro de la familia diera positivo. El análisis incluyó a los participantes que dieron negativo para el SARS-CoV-2 por medio de un hisopo nasal, de saliva o nasofaríngeo y que eran seronegativos a los anticuerpos del SARS-CoV-2 al inicio del estudio. En este análisis descriptivo provisional de participantes con riesgo de infección por SARS-CoV-2 por transmisión doméstica, una dosis subcutánea del cóctel de anticuerpos casirivimab/imdevimab previno la infección sintomática, redujo la infección general y disminuyó la carga viral y la duración de la detección del ARN viral (O'Brien *et al.* 2021).

REGEN-COV2 fue aprobado para su uso clínico por la FDA en virtud de dos Autorizaciones de Uso de Emergencia emitidas en noviembre de 2020 y mayo de 2021, que permitían su uso para el tratamiento del COVID-19, de leve a moderado, en adultos y pacientes pediátricos (a partir de 12 años de edad y con un peso mínimo de 40 kg) con resultados positivos en las pruebas virales directas de SARS-CoV-2, y que presentan un alto riesgo de progresión a COVID-19 grave, incluyendo la hospitalización o la muerte. El Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) de la EMA avala el uso de la combinación de los anticuerpos casirivimab e imdevimab, como opción de

tratamiento para los pacientes con COVID-19 confirmada, que no requieren oxígeno suplementario y con un alto riesgo de progresar a una situación grave. Sin embargo, el 24 de enero de 2022, la FDA modificó la EUA para REGEN-COV2 debido a la variante Ómicron (B.1.1.529) que no es susceptible al tratamiento y no está actualmente autorizado para su uso donde la variante dominante es Ómicron.

— **Evusheld (Tixagevimab/Cilgavimab)** es una combinación de dos mAbs humanos de acción prolongada dirigidos contra la proteína espiga de superficie del SARS-CoV-2, impidiendo que el virus interactúe con el receptor humano ACE2 (Abramowicz *et al.* 2022). La FDA emitió una EUA de tixagevimab y cilgavimab para la profilaxis previa a la exposición de COVID-19 en personas ≥12 años que pesen ≥40 kg y que tengan un historial de alergia grave que impida su vacunación contra COVID-19 o un compromiso inmunológico moderado o grave. La emisión se basó en los resultados de un ensayo clínico aleatorizado doble ciego y controlado con placebo (PROVENT) en 5172 adultos que no estaban vacunados contra COVID-19 y que presentaban un riesgo elevado debido a su edad (≥60 años), a una comorbilidad (por ejemplo, obesidad, EPOC, compromiso inmunitario, antecedentes de reacciones adversas graves/severas a cualquier vacuna autorizada por la FDA), o que por su situación residencial o laboral no habían recibido una vacuna COVID-19 y no tenían antecedentes de infección por SARS-CoV-2 ni habían dado positivo en las pruebas de infección por SARS-CoV-2 al inicio del ensayo (tabla 2).

  Según los datos clínicos de PROVENT, se estima que la duración de la protección tras la administración de una dosis única de Evusheld es de al menos 6 meses. Los ensayos clínicos con Evusheld se llevaron a cabo cuando las variantes Alpha, Beta, Gamma y Delta eran predominantes. Sin embargo, debido a la disminución observada en la actividad de neutralización *in vitro* frente a las subvariantes de Ómicron BA.1, BA.1.1 BA.4 y BA.5, no existe certeza sobre la eficacia de tixagevimab y cilgavimab frente a las actuales subvariantes circulantes del Ómicron SARS-CoV-2. Es posible que ciertas variantes víricas del SARS-CoV-2 no sean neutralizadas por anticuerpos monoclonales como el tixagevimab y el cilgavimab, y que este no sea eficaz para prevenir la enfermedad causada por estas variantes víricas del SARS-CoV-2.

— **Bebtelovimab.** El 11 de febrero de 2022, la FDA emitió una EUA para el anticuerpo monoclonal bebtelovimab para el tratamiento del COVID-19 leve a moderado en adultos y pacientes pediátricos (a partir de los 12 años de edad y con un peso mínimo de 40 kg) con resultados positivos en las pruebas virales directas de SARS-CoV-2, y que tengan un alto riesgo de progresión a COVID-19 grave, incluyendo hospitalización o muerte, y para quienes las opciones alternativas de tratamiento del COVID-19 aprobadas o autorizadas por la FDA no sean accesibles o clínicamente apropiadas. Bebtelovimab es un mAb humano neutralizante recombinante que se une a la proteína espiga del SARS-CoV-2. Basándose en datos *in vitro*, se espera que el bebtelovimab tenga actividad contra una amplia gama de variantes del SARS-CoV-2, incluida la variante B.1.1.529 (Ómicron) de interés (VOC) y sus subvariantes BA.1 y BA.2 (Westendorf *et al.* 2021; Iketani *et al.* 2022). En un estudio de fase 2 en pacientes con bajo riesgo de progresión de la enfermedad que estaban infectados predominantemente con las variantes B.1.617.2 (Delta) o B.1.1.7 (Alfa), bebtelovimab demostró actividad virológica y redujo la duración de los síntomas. Sin embargo, hay datos clínicos limitados sobre el uso de bebtelovimab en pacientes con COVID-19 leve a moderado que tienen un alto riesgo de progresión de la enfermedad (la población para la que está autorizado el anticuerpo). Los datos clínicos que apoyan la EUA para bebtelovimab provienen de resultados seleccionados en el ensayo clínico de fase 2 BLAZE-4, que incluyó a pacientes no hospitalizados con COVID-19 leve a moderado. Actualmente, no hay publicaciones revisadas por pares sobre estos datos. Se necesitan ensayos controlados aleatorios más amplios para evaluar plenamente su eficacia en esta población.

— **Regdanvimab** (Regkirona). Es un mAb tipo IgG1 humano recombinante que se fija al RBD de la proteína S del SARS-CoV-2, que inhibe estéricamente la interacción con la ACE2, y por consiguiente, bloquea su introducción en la célula y la infección por SARS-CoV-2 (Kim *et al.* 2021). Recibió la aprobación en Corea del Sur en febrero de 2021 para el tratamiento de pacientes con COVID-19 de leve a moderado con factores de riesgo de progresión a enfermedad grave (Syed 2021). Posteriormente la EMA aprobó el regdanvimab (noviembre de 2021) para su uso en pacientes adultos con COVID-19 que no requieren oxígeno suplementario y tienen un alto riesgo de evolucionar a COVID-19 grave. En un ensayo controlado aleatorizado de fase 2/3, el regdanvimab acortó la duración del SARS-CoV-2 y redujo la hospitalización y la terapia con oxígeno en pacientes con COVID-19 de leve a moderado (Streinu-Cercel *et al.* 2022). Varios estudios han demostrado que el tratamiento con regdanvimab se asoció a un

menor riesgo de progresión a enfermedad grave en el período de variantes SARS-CoV-2 pre-delta (Lee *et al.* 2021; Streinu-Cercel *et al.* 2022). Sin embargo, se dispone de pocos datos sobre la eficacia clínica del tratamiento con regdanvimab para la variante delta, aunque los experimentos *in vitro* y con animales sugieren que su actividad está disminuida, pero sigue siendo eficaz (Lee *et al.* 2022). Estudios anteriores demostraron que el tratamiento con regdanvimab tendía a reducir la progresión de la enfermedad en las infecciones de la variante delta, pero ese efecto no alcanzó significación estadística debido al reducido número de pacientes y a la insuficiente potencia estadística de esas investigaciones (Ryu *et al.* 2021; Lee *et al.* 2022; Jang *et al.* 2023). Regdanvimab no se utiliza actualmente debido a su actividad reducida contra las nuevas variantes del SARS-CoV-2, incluida Ómicron y subvariantes (B.1.1.529; BA.1.1; BA.1; BA.1 [+Q493K]; BA.2; B.1.1.529 [+F694Y] (VanBlargan *et al.* 2022).

Aunque los mAbs son generalmente bien tolerados, su administración, en general, se asocia con el riesgo de reacciones inmunológicas que incluyen anafilaxia, enfermedad del suero y generación de anticuerpos. Los efectos adversos de los mAbs utilizados en el COVID-19 son desconocidos, principalmente debido a la limitada disponibilidad de la literatura publicada. Los efectos adversos más frecuentemente notificados con el uso de la terapia combinada de bamlanivimab y etesevimab fueron náuseas y diarrea. También se observaron otros acontecimientos adversos como reacciones de hipersensibilidad inmediata relacionadas con la infusión que se manifiestan como prurito, rubor, sarpullido e hinchazón facial con el tratamiento combinado de bamlanivimab y etesevimab. Se observó una baja incidencia de acontecimientos adversos graves y de reacciones de hipersensibilidad o relacionadas con la infusión con casirivimab e imdevimab. Los efectos adversos notificados con mayor frecuencia con el uso de sotrovimab incluyen reacciones de hipersensibilidad relacionadas con la infusión, sarpullido y diarrea. El bebtelovimab puede producir reacciones alérgicas durante y después de su administración.

5.2. Fármacos inmunomoduladores

La patogenia de la enfermedad grave por COVID-19 implica una desregulación de la respuesta inflamatoria del huésped frente al SARS-CoV-2. En la inmunopatogenia de múltiples enfermedades autoinmunes existe una alteración de la respuesta inmune adaptativa y por ello una asociación con determinados genes que codifican antígenos leucocitarios humanos (HLA) (Cavalli *et al.* 2020). En cambio, en los pacientes con COVID-19 que desarrollan hiperinflamación parecen estar involucrados genes que intervienen en la respuesta inmune innata, tales como los que codifican determinados Toll Like Receptors (TLR), lo que ayudaría a explicar la marcada síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias (tormenta de citoquinas) que suele presentarse más tarde en el curso de la infección.

La tormenta de citoquinas en el COVID-19 se cree que es resultado de un desequilibrio entre la respuesta antiviral e inmune con excesiva liberación citoquinas proinflamatorias causando daño pulmonar y probablemente predisponiendo a los pacientes a eventos tromboembólicos. Esta etapa se manifiesta clínicamente por el desarrollo de una neumonía grave que conduce al síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y a la necesidad de ventilación mecánica. Esta tormenta proinflamatoria se asocia con un alto riesgo de fallo multiorgánico y mortalidad. En consecuencia, existe un gran interés en el uso de compuestos farmacológicos dirigidos contra estas citoquinas. El COVID-19 grave se caracteriza por niveles plasmáticos elevados de interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), y disminuidos los de interferón, lo que sugiere que la hiperinflamación es un factor fundamental para el inicio del SDRA relacionado con el SARS-CoV-2 y por tanto una posible diana terapéutica.

— **Corticosteroides.** El COVID-19 severo se asocia con una lesión pulmonar relacionada con la inflamación impulsada por la liberación de citoquinas. Durante el curso inicial de la pandemia, la eficacia de los glucocorticoides en pacientes con COVID-19 no estaba bien descrita. Era un tema de debate e incertidumbre debido exclusivamente a la falta de datos científicos procedentes de ensayos clínicos aleatorios y a gran escala. El ensayo «Randomized Evaluation of COVID-19 Therapy» (RECOVERY), incluyó que los pacientes hospitalizados con sospecha clínica o confirmación de laboratorio de SARS-CoV-2 que fueron asignados aleatoriamente a recibir dexametasona (n = 2104) o atención habitual (n = 4321), demostró que el uso de **dexametasona** dio lugar a una menor mortalidad a los 28 días en los pacientes que recibían ventilación mecánica invasiva o soporte de oxígeno, pero no en los pacientes que no recibían ningún soporte respiratorio (Horby *et al.* 2021). Basándose en los resultados de este ensayo, la dexametasona se considera actualmente el estándar de atención, en monoterapia o en combinación con remdesivir, según la gravedad de la enfermedad en pacientes hospitalizados que requieren ventilación mecánica.

— **Interferón-β-1a** (IFN-β-1a). Los interferones son citoquinas esenciales para la respuesta inmunitaria a

una infección vírica y se ha demostrado que el SARS-CoV-2 suprime su liberación *in vitro*. El interferón inhibe la replicación del SARS-CoV-2 *in vitro*. Algunos ensayos han sugerido un beneficio clínico del IFN-β-1a para pacientes con COVID-19, aunque las limitaciones metodológicas reducen la confianza de los hallazgos. Se necesitan más estudios para aclarar el papel del IFN-β-1a en la terapia del COVID-19 (Ranieri *et al.* 2020).

Los resultados de un pequeño ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en pacientes con COVID-19, mostraron que el uso de IFN-β-a inhalado tenía mayores probabilidades de mejora clínica y recuperación en comparación con el placebo (Monk *et al.* 2021). Por otro lado, en otro pequeño ensayo clínico aleatorizado, mostró que la respuesta clínica con el uso de IFN-β-1a inhalado, no fue significativamente diferente a los resultados del grupo control. Sin embargo, cuando se utilizaba de forma precoz, este agente daba lugar a una menor duración de la estancia en el hospital y a una disminución de la tasa de mortalidad a los 28 días (Davoudi-Monfared *et al.* 2020).

En la actualidad, no se dispone de datos sobre la eficacia del IFN-β-1a sobre las tres nuevas variantes del SARS-CoV-2 (B.1.1.7; B.1.351 y P.1), debido a la insuficiente y escasa obtención de datos sobre su uso y el relativo potencial de toxicidad. Esta terapia es ineficaz en los pacientes hospitalizados con COVID-19 y no se recomienda actualmente para tratar la infección por COVID-19 (Zhang *et al.* 2021).

— **Anticuerpos frente a la interleucina 1 (IL-1): Anakinra.** Como ya hemos mencionado, la patogénesis del COVID-19 implica una respuesta inmune de hospedaje desregulada e inflamación excesiva, que puede conducir al síndrome de dificultad respiratoria aguda y a un fallo multiorgánico caracterizado por una respuesta hiperinflamatoria asociada a niveles plasmáticos elevados de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y la IL-6 (Mehta *et al.* 2020), lo que sugiere que la hiperinflamación es un factor fundamental para el inicio del SARS relacionado con el SARS-CoV-2 y por tanto una posible diana terapéutica.

Anakinra es un antagonista recombinante del receptor IL-1 que tradicionalmente se ha utilizado en escenarios con características similares a las de la hiperinflamación COVID-19, incluyendo el síndrome de activación del macrófago causado por trastornos inflamatorios graves y shock séptico (Shakoory *et al.* 2016). El beneficio de anakinra en pacientes con COVID-19 se evaluó en varios estudios prospectivos y retrospectivos no randomizados que mostraron mejores resultados en términos de mortalidad y ventilación mecánica. La evidencia de los ensayos clínicos aleatorizados es limitada. Sobre la base del estudio SAVE-MORE (Tratamiento de Anakinra guiado por su AVE-Guided para la validación del riesgo y la gestión temprana de la insuficiencia respiratoria severa por COVID-19) (Kyriazopoulou *et al.* 2021), la EMA autorizó el uso de anakinra para el tratamiento de pacientes adultos con neumonía COVID-19 que requieren oxígeno suplementario que corren el riesgo de progresar a insuficiencia respiratoria grave según lo determinado por niveles elevados de urokinasa (un activador de plasminógeno). Un ensayo clínico aleatorizado diseñado para evaluar la eficacia y seguridad de la anakinra en pacientes con neumonía COVID-19 grave e hiperinflamación, anakinra no demostró la necesidad de ventilación mecánica ni redujo el riesgo de mortalidad entre los pacientes hospitalizados con neumonía COVID-19 grave (Fanlo *et al.* 2023).

— **Anticuerpos monoclonales contra el receptor de la IL-6**. La IL-6 es una citoquina proinflamatoria que se considera el motor clave del estado hiperinflamatorio asociado al COVID-19. Estudios previos han mostrado que la IL-6 se encuentra significativamente elevado en algunos pacientes graves con COVID-19 con SDRA a pesar de una carga viral disminuida (Wang *et al.* 2020c). Estos resultados sugieren que una respuesta inmunitaria exuberante más que la virulencia viral es posiblemente responsable de la patología a nivel tisular. En este sentido la terapia antiviral por sí sola pudiera no ser suficiente. Dirigirse a esta citoquina con un inhibidor del receptor de la IL-6 podría ralentizar el proceso de inflamación, según muestran los informes de casos con resultados favorables en pacientes con COVID-19 grave (Conti *et al.* 2020). Estudios recientes han demostrado que los inhibidores de la señalización de la IL-6 reducen la tasa de mortalidad sin aumentar las infecciones secundarias en los pacientes con COVID-19 no mostrando ningún beneficio en pacientes con enfermedad crítica (Han *et al.* 2020).

— **Tocilizumab.** Es un anticuerpo monoclonal contra el receptor alfa de la interleucina 6 (IL-6α) indicado para diversas enfermedades reumatológicas. Los datos relativos al uso de este anticuerpo dirigido a IL-6 para el tratamiento del COVID-19 son contradictorios. Un ensayo clínico controlado aleatorio en el que participaron 438 pacientes hospitalizados con neumonía grave COVID-19, entre los que 294 fueron asignados al azar a recibir tocilizumab y 144 a placebo, mostró que tras la administración de tocilizumab no había mejora significativa del estado clínico, ni en una disminución de la mortalidad a los 28 días, en comparación con el placebo (Rosas *et al.* 2021). Los

resultados de otro ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo en el que participaron 243 pacientes con COVID-19 grave, que fueron asignados aleatoriamente a recibir tocilizumab o placebo, mostraron que el uso de tocilizumab, no fue eficaz para prevenir la intubación o la tasa de mortalidad (Stone *et al.* 2020). Los ensayos REMAP-CAP y RECOVERY dos ensayos controlados aleatorizados, muestran pruebas de un beneficio en cuanto a la mortalidad en los pacientes que presentaban una descompensación respiratoria rápida (Gordon *et al.* 2021). El tocilizumab ha demostrado reducir el número de personas hospitalizadas que mueren a causa del COVID-19 en el transcurso de los 28 días de tratamiento. Sin embargo, es probable que la diferencia en la mejoría clínica (definida como el alta del hospital o la mejoría de los síntomas de COVID-19) sea escasa o nula (Ghosn *et al.* 2023).

— **Sarilumab y Siltuximab.** Son antagonistas de los receptores de la IL-6 que potencialmente pueden tener un efecto similar a tocilizumab sobre el estado hiperinflamatorio asociado al COVID-19. No se conocen ensayos clínicos publicados que apoyen el uso de siltuximab en el COVID-19 grave. Por el contrario, un ensayo multinacional de fase 3 con sarilumab, aleatorizado, doble ciego y con control de placebo, de 60 días de duración, que evaluó la eficacia clínica, la mortalidad y la seguridad en 431 pacientes, no mostró ninguna mejora significativa del estado clínico, ni de la tasa de mortalidad (Lescure *et al.* 2021). Actualmente está en curso otro estudio aleatorizado, doble ciego y con control de placebo sobre la eficacia clínica y la seguridad del sarilumab en pacientes adultos hospitalizados por COVID-19 (NCT04315298).

En resumen, la evidencia de un efecto de sarilumab y los otros agentes bloqueantes de IL-6 sobre resultados críticos es todavía incierta o muy incierta.

5.3. Plasma de convalecencia

Las inmunoglobulinas y el plasma de convalecencia son obtenidos de personas que se han recuperado del COVID-19. Dado que la respuesta inmunitaria primaria del huésped aparece entre 7 y 14 días después de la infección (ver fig. 1), el plasma debe obtenerse de los donantes no antes de la segunda o tercera semana después de la infección del SARS-CoV-2 (Zuo *et al.* 2020). El plasma proporcionaría una inmunidad pasiva y, por lo tanto, podría reducir tanto la gravedad como la duración de la enfermedad, por lo que podría estar indicado en pacientes hospitalizados y, especialmente en pacientes inmunodeprimidos.

La terapia con plasma de convalecencia se evaluó durante las epidemias de SARS, MERS y Ébola. Sin embargo, a pesar de la experiencia en otras epidemias víricas y su seguridad, todavía no hay resultados claros en términos de eficacia en infecciones de etiología viral (Mair-Jenkins *et al.* 2015). Diversos estudios *in vitro* del plasma de convalecencia obtenido de individuos previamente infectados con las cepas ancestrales de SARS-CoV-2 demostraron una neutralización significativamente reducida o una resistencia notablemente mayor a la neutralización por parte del plasma de convalecientes contra la cepa beta (B.1.351) (Wibmer *et al.* 2021; Wang P *et al.* 2021). La FDA aprobó el 9 de marzo de 2021 la terapia con plasma convaleciente para pacientes con COVID-19 grave con riesgo de muerte (Joyner *et al.* 2020). Aunque parecía prometedor, los datos de varios ensayos clínicos controlados y estudios observacionales que evaluaban el uso del plasma convaleciente en el COVID-19 con riesgo de muerte han proporcionado resultados no concluyentes con respecto a los efectos beneficiosos del plasma convaleciente en pacientes hospitalizados por COVID-19 (Simonovich *et al.* 2021; RECOVERY Collaborative Group 2021). Los datos de estos estudios no mostraron diferencias significativas en la mejoría clínica o la mortalidad global en los pacientes tratados con plasma de convalecencia frente a la terapia estándar. Un estudio retrospectivo basado en un registro nacional de EE. UU. informó de que entre los pacientes hospitalizados con COVID-19, no sometidos a ventilación mecánica, hubo un menor riesgo de muerte en los pacientes que recibieron una transfusión de plasma de convalecencia con un nivel más alto de anticuerpos IgG anti-SARS-CoV-2 que en los pacientes que recibieron una transfusión de plasma de convalecencia con niveles bajos de anticuerpos. Las evidencias actuales sugieren que los posibles efectos beneficiosos del plasma convaleciente pueden limitarse al subgrupo de pacientes no críticos que reciben títulos altos de anticuerpos al principio del curso de la enfermedad antes de desarrollar su propia respuesta inmune humoral, o a pacientes inmunocomprometidos que pueden no articular una respuesta inmune efectiva (Ortigoza *et al.* 2022).

5.4. Otros tratamientos

5.4.1. Inhibidores de la Janus quinasa (JAK)

Los inhibidores de JAK son una clase de fármacos que inhiben la señalización intracelular en respuesta a numerosas interleucinas, interferones, factores estimulantes de colonias y hormonas. En consecuencia, interfieren en muchas respuestas celulares, como las respuestas antivirales, la expresión de la ACE2, la función y diferenciación de las células T y la activación de los macrófagos.

El baricitinib, el ruxolitinib y el tofacitinib son tres de los al menos nueve inhibidores de la JAK. Estos inhibidores de la JAK se han propuesto como tratamientos para el COVID-19 porque pueden impedir la fosforilación de las proteínas clave implicadas en la transducción de señales que participan en funciones celulares vitales, como la señalización, el crecimiento y la supervivencia que conducen a la activación inmunitaria y la inflamación (por ejemplo, la respuesta celular a citoquinas proinflamatorias como la IL-6 (Zhang *et al.* 2020). La inmunosupresión inducida por los inhibidores de JAK podría reducir potencialmente la inflamación y las inmunopatologias asociadas observadas en pacientes con COVID-19.

— **Baricitinib.** Es un inhibidor selectivo oral de la Janus quinasa (JAK) 1 y la JAK 2 indicado actualmente para pacientes con artritis reumatoide de moderada a grave. El baricitinib se consideró un tratamiento potencial para el COVID-19 por su efecto inhibidor de la endocitosis del SARS-CoV-2 *in vitro* y de la vía de señalización intracelular de las citoquinas que causan el estado hiperinflamatorio de inicio tardío que da lugar a la enfermedad grave (Stebbing *et al.* 2020). Este doble efecto inhibidor lo convierte en un fármaco terapéutico prometedor contra todas las fases del COVID-19.

  Un estudio observacional y retrospectivo multicéntrico de 113 pacientes hospitalizados con neumonía por COVID-19 que recibieron baricitinib combinado con lopinavir/ritonavir (brazo de baricitinib, n = 113) o hidroxicloroquina y lopinavir/ritonavir informó de una mejora significativa de los síntomas clínicos y de la tasa de mortalidad a las dos semanas con baricitinib.

  Por otra parte, los resultados del estudio ACTT-2 (tratamiento adaptativo del COVID-19), un ensayo doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo que evaluó baricitinib más remdesivir en pacientes adultos hospitalizados con COVID-19, demostraron que la terapia combinada de baricitinib más remdesivir era superior a la terapia con remdesivir no solo en la reducción del tiempo de recuperación sino también en la aceleración de la mejora clínica en pacientes hospitalizados con COVID-19, en particular los que recibían suplementos de oxígeno de alto flujo o ventilación no invasiva (Kalil *et al.* 2021). Baricitinib, en combinación con remdesivir, ha sido aprobado para su uso clínico en pacientes hospitalizados con COVID-19. La eficacia de baricitinib solo o en combinación con remdesivir no se ha evaluado en las variantes de SARS-CoV-2, y hay datos limitados sobre el uso de baricitinib con dexametasona.

— **Ruxolitinib.** Es otro inhibidor selectivo oral de JAK 1 y 2 que está indicado para los trastornos mieloproliferativos, la policitemia vera y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) resistente a esteroides. Al igual que baricitinib, se ha planteado la hipótesis de que tiene un efecto inhibidor de la vía de señalización intracelular de las citoquinas, lo que lo convierte en un tratamiento potencial contra el COVID-19. Los resultados de un pequeño ensayo prospectivo multicéntrico controlado y aleatorizado de fase 2 que evaluó la eficacia y la seguridad de ruxolitinib no informaron de ninguna diferencia estadística con respecto al tratamiento estándar. Sin embargo, la mayoría de los pacientes demostraron una mejora significativa en el TAC de tórax y una recuperación más rápida de la linfopenia (Cao *et al.* 2020a).

— **Tofacitinib.** Otro inhibidor selectivo oral de JAK 1 y JAK3 que está indicado para la AR de moderada a grave, la artritis psoriásica y la colitis ulcerosa de moderada a grave. Dado su efecto inhibidor de la cascada inflamatoria, se planteó la hipótesis de que su uso podría mejorar la lesión pulmonar mediada por la inflamación viral en pacientes con COVID-19 grave. Los resultados de un pequeño ensayo controlado y aleatorizado que evaluó la eficacia y en el que participaron 289 pacientes que fueron asignados al azar para recibir tofacitinib o placebo mostraron que el tofacitinib conllevaba un menor riesgo de insuficiencia respiratoria o muerte (Guimarães *et al.* 2021).

De acuerdo con las últimas recomendaciones emitidas por la FDA sobre los inhibidores de la JAK basadas en tres ensayos con 2659 participantes para baricitinib, dos con 475 participantes para ruxolitinib y uno con 289 participantes para tofacitinib existe una fuerte recomendación para el uso de baricitinib como alternativa a los bloqueantes del receptor de IL-6, en combinación con corticosteroides, en pacientes con COVID-19 grave o crítico. Asimismo, hay una recomendación condicional contra el uso de ruxolitinib y tofacitinib para pacientes con COVID-19 grave o crítico (Agarwal *et al.* 2022).

5.4.2. Inhibidores de la tirosina quinasa

Acalabrutinib, ibrutinib y rilzabrutinib, son inhibidores de la tirosina quinasa que regulan la señalización y la activación de los macrófagos, actualmente aprobados por la FDA para algunas neoplasias hematológicas. Se ha propuesto que la activación de los macrófagos se produce durante la respuesta inmunitaria hiperinflamatoria que se observa en el COVID-19 grave. Los resultados de un pequeño estudio *off-label* (fuera de la ficha técnica) de 19 pacientes hospitalizados con COVID-19 grave que recibieron acalabrutinib destacaron el beneficio clínico potencial de la inhibición de estos inhibidores

(Roschewski *et al.* 2020). Los ensayos clínicos están en curso para validar la eficacia real en la enfermedad COVID-19 grave.

5.5. Otros fármacos estudiados para su uso en pacientes con COVID-19 de dudosa eficacia

Entre los fármacos que se han utilizado masivamente y que ahora se ha demostrado su ineficacia, destacamos hidroxicloroquina/cloroquina, ivermectina, azitromicina, y lopinavir/ritonavir. A continuación, detallaremos qué motivó su uso y por qué ya no se utilizan.

— **Hidroxicloroquina y Cloroquina.** La hidroxicloroquina y la cloroquina son medicamentos aprobados para el tratamiento del lupus eritematoso, la artritis reumatoide y la malaria. Fueron de los primeros tratamientos utilizados al principio de la pandemia de COVID-19, y muchos pacientes hospitalizados recibieron hidroxicloroquina/cloroquina de forma empírica. Se pensó que la hidroxicloroquina era eficaz debido a los resultados de los experimentos *in vitro* y modelos farmacocinéticos. Sin embargo, aunque algunos ensayos observacionales retrospectivos sugirieron un beneficio potencial, todos los ensayos clínicos aleatorios posteriores no lograron demostrar su beneficio (Cavalcanti *et al.* 2020; Mitjà *et al.* 2021). Estos fármacos presentan una eficacia anticoronavírica inconsistente *in vitro* y en modelos animales, y no tienen una eficacia convincente y sí problemas de seguridad sustanciales en la abrumadora mayoría de ensayos retrospectivos-observacionales, ensayos clínicos aleatorizados y estudios de metaanálisis en pacientes hospitalizados con COVID-19 (Stefano *et al.* 2022). La mayoría de estos estudios no encontraron eficacia; no se demostró su utilidad como profilaxis posexposición, ni previnieron la infección por SARS-CoV-2, ni la enfermedad sintomática por COVID-19. En algunos de estos estudios se informó de prolongación del QT y de un aumento de los acontecimientos adversos y de la mortalidad. En conclusión, todos los estudios realizados hasta la fecha indican que la hidroxicloroquina/cloroquina es ineficaz en los pacientes hospitalizados con COVID-19, tanto en las poblaciones generales como en las subpoblaciones, y que no debe administrarse fuera de los ensayos clínicos aleatorizados con un sólido consentimiento informado sobre el improbable beneficio y el probable daño (Freilich *et al.* 2022).

— **Ivermectina.** La ivermectina es un fármaco antiparasitario ampliamente disponible y barato que ha demostrado una importante actividad antiviral *in vitro* contra numerosos virus de ARN (Heidary y Gharebaghi 2020), y que ha demostrado inhibir la replicación del SARS-CoV-2 al reducir hasta 5000 veces los niveles de ARN del virus (Caly *et al.* 2020). En abril de 2020, pruebas de laboratorio similares sugirieron un efecto débil en la ralentización de la reproducción del virus que causa el COVID-19, el SARS-CoV-2. Durante 2020, se iniciaron más de 30 estudios clínicos para probar la ivermectina como tratamiento del COVID-19 en humanos. Varios de los pequeños estudios iniciales han finalizado desde entonces. Algunos de estos estudios sugirieron mayores tasas de supervivencia con la ivermectina. Un estudio de cohorte observacional retrospectivo realizado en historias clínicas de pacientes con COVID-19 tratados con y sin ivermectina mostró una menor mortalidad en el grupo de la ivermectina (15 % frente a 25,2 %), y fue menor en los pacientes con enfermedad grave (38,8 % frente a 80,7 %) (Rajter *et al.* 2021). Otro ensayo de control aleatorio doble ciego de un solo centro en el que participaron 476 pacientes adultos con enfermedad leve por COVID-19 se asignaron al azar para recibir ivermectina 300 mcg/kg de peso corporal durante cinco días o placebo no logró una mejora significativa ni la resolución de los síntomas (López-Medina *et al.* 2021). En conclusión, las pruebas actuales no apoyan el uso de la ivermectina para el tratamiento o la prevención del COVID-19 fuera de los estudios clínicos aleatorizados bien diseñados.

— **Azitromicina.** La azitromicina tiene, además de su actividad bacteriostática un efecto inmunomodulador, antiinflamatorio y antiviral (Zarogoulidis *et al.* 2012). También se ha demostrado que puede mejorar a pacientes con SDRA (Kawamura *et al.* 2018). Basándose en estos hechos, se ha utilizado empíricamente en pacientes con COVID-19, especialmente en los casos moderados-graves. Su uso también se ha justificado con la intención de reducir la sobreinfección bacteriana en pacientes críticos. Una revisión sistemática y un metaanálisis no encontró diferencias estadísticamente significativas en la tasa de mortalidad, ventilación mecánica o ingreso hospitalario entre los pacientes con COVID-19 tratados con azitromicina (Mangkuliguna *et al.* 2021). Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la administración de antibióticos durante esta pandemia, ya que el uso inapropiado de antibióticos puede conducir a un aumento de la resistencia antimicrobiana.

— **Lopinavir/ritonavir** es una terapia combinada aprobada por la FDA para el tratamiento del VIH y se propuso como terapia antiviral contra el COVID-19 durante el inicio de la pandemia en base a la actividad *in vitro* mostrada por esta combinación frente a los virus SARS-CoV y MERS-CoV (Alhumaid *et al.* 2020).

Sin embargo, un ensayo clínico doble ciego y aleatorizado, con lopinavir potenciado con ritonavir no demostró mejoría en la supervivencia de pacientes graves con infección por SARS-CoV-2 hospitalizados, aunque en este caso el fármaco era administrado en etapas evolucionadas de la infección (Cao *et al.* 2020b). Posteriormente el ensayo clínico RECOVERY, ensayo abierto y aleatorizado, tampoco ha demostrado reducción de la mortalidad en pacientes hospitalizados con COVID-19, incluso en pacientes en los que se inicia el tratamiento en los primeros 7 días de síntomas (RECOVERY collaborative group 2020). En espera de resultados concluyentes sobre el lopinavir-ritonavir, su uso se considera *off-label*, ya que hasta la fecha el lopinavir-ritonavir no está aprobado por la FDA como tratamiento del COVID-19. Actualmente, el lopinavir/ritonavir no está indicado para el tratamiento del COVID-19 en pacientes hospitalizados y no hospitalizados (Zhang *et al.* 2021).

En conclusión, la hidroxicloroquina/cloroquina, la ivermectina, la azitromicina, y lopinavir/ritonavir, aunque han sido ampliamente utilizados, actualmente se descartan para el tratamiento del COVID-19, ya que tras amplios estudios con grandes poblaciones no han mostrado beneficio.

6. COVID-19: ENSAYOS CLÍNICOS EN CURSO

Los esfuerzos mundiales por identificar intervenciones eficaces para la prevención y el tratamiento del COVID-19 han dado a un gran número de ensayos clínicos para probar un posible tratamiento. Debido a la falta de un tratamiento etiológico para el SARS-CoV-2 y a las dificultades que conlleva el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de estos ensayos tienen como objetivo reutilizar medicamentos de uso común, algunos medicamentos ya aprobados para otras enfermedades o con eficacia contra el SARS y el MERS incluyendo combinaciones de antipalúdicos, antigripales y anti-VIH, así como otros fármacos conocidos con otras indicaciones como la colchicina, la vitamina D, la metformina y la fluvoxamina. Sin embargo, la evidencia es insuficiente para recomendar el uso de estos fármacos.

Al comienzo de la pandemia se realizaron numerosos ensayos clínicos. En la mayoría de los estudios, el ámbito terapéutico (prevención, tratamiento precoz, y tratamiento de casos moderados a graves) del fármaco investigado no siempre estaba claramente definido. La población elegible era a menudo heterogénea y el tamaño de la población inscrita restringido, lo que reducía la solidez estadística de los resultados. Sin embargo, ahora se dispone de una imagen más clara del beneficio clínico real de la prevención farmacológica y el tratamiento del COVID-19 en comparación con el comienzo de la pandemia. En este sentido, se han realizado numerosos ensayos incluyendo los principales tratamientos farmacológicos propuestos frente al SARS-CoV-2: antivirales y fármacos inmunomoduladores. Actualmente, a fecha de 22 de diciembre de 2023, hay 9474 ensayos clínicos (ClinicalTrials.org). De estos 9474 ensayos, el 7 % (641 estudios) incluyen terapia farmacológica para el tratamiento del COVID-19, habiéndose completado 242 y finalizando 94 estudios.

7. ERA OMICRÓNICA. ESTADO ACTUAL DE LOS TRATAMIENTOS CONTRA EL COVID-19

Actualmente la situación epidemiológica es menos compleja y aunque la pandemia de la enfermedad por coronavirus de 2019 ha terminado oficialmente, el SARS-CoV-2 sigue propagándose y evolucionando con aparición de nuevas variantes víricas emergentes que eluden la inmunidad del huésped, lo que supone una amenaza persistente para la salud pública. Estas nuevas variantes del SARS-CoV-2 se han convertido en un importante problema virológico, epidemiológico y clínico, especialmente respecto al riesgo de evadir de la inmunidad inducida por las vacunas frente al SARS-CoV-2. Según la OMS, desde la primera introducción de la vacuna COVID-19 en julio de 2020, hasta finales de noviembre de 2023 se habían administrado 13.59 billones de dosis totales en todo el mundo (67 % de población total vacunada con al menos una dosis de una vacuna COVID-19.

El desarrollo de una terapia antiviral eficaz contra el SARS-CoV-2 sigue siendo fundamental para los que están a la espera de la vacunación, así como para los millones de personas inmunodeprimidas que se calcula que no pueden responder de forma sólida a la vacunación. Además, la continua aparición y propagación de nuevas variantes que escapan al sistema inmunitario significa que incluso las personas inmunocompetentes probablemente tengan tasas de fracaso de la vacuna más altas que las observadas en los ensayos clínicos realizados en los primeros momentos de la pandemia.

La falta de un tratamiento respaldado por suficiente evidencia científica ha llevado al empleo de diferentes pautas terapéuticas y modificaciones rápidas de los protocolos y supone un reto sin precedentes para identificar fármacos eficaces para su prevención y tratamiento. No obstante, a pesar de la falta de terapias probadas y la necesidad de ensayos clínicos que permitan establecer pautas de tratamiento basadas en la evidencia, la rápida expansión de los conocimientos sobre la virología del SARS-CoV-2 proporciona un número importante de

posibles objetivos farmacológicos y desarrollo de alternativas terapéuticas frente a la infección por SARS-CoV-2, habiéndose logrado progresos sustanciales en la terapéutica de pacientes con COVID-19 leve o moderado (Gandhi *et al.* 2022).

Las variantes actuales del virus del COVID-19 tienden a causar un cuadro menos grave de la enfermedad, mientras que los niveles de inmunidad son más elevados como consecuencia de la vacunación, lo que ha reducido el riesgo de enfermedad grave y fallecimiento para la mayoría de los pacientes.

El 10 de noviembre de 2023 la OMS actualizó sus directrices sobre los tratamientos contra el COVID-19. Esta nueva actualización incluye nuevos niveles de referencia en cuanto a las estimaciones de riesgo de ingreso hospitalario en el caso de los pacientes que no presentan un cuadro grave de COVID-19. La nueva categoría de «riesgo moderado» incluye ahora a las personas que antes se consideraban de alto riesgo, como las personas de edad y/o las personas con afecciones crónicas, discapacidad y comorbilidades de enfermedades crónicas. Estas estimaciones de riesgo actualizadas ayudarán a los profesionales de la salud a identificar a las personas con un riesgo de ingreso hospitalario alto, moderado o bajo, y a adaptar el tratamiento de acuerdo con los siguientes riesgos:

— Alto: las personas inmunodeprimidas siguen teniendo un mayor riesgo si contraen el COVID-19, con una tasa de hospitalización estimada del 6 %.
— Moderado: las personas mayores de 65 años, las personas con afecciones como obesidad, diabetes y/o afecciones crónicas, en particular la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o una enfermedad renal o hepática, cáncer, las personas con discapacidad y las personas con comorbilidades de las enfermedades crónicas tienen un riesgo moderado, con una tasa de hospitalización estimada del 3 %.
— Bajo: las personas que no pertenezcan a las categorías de riesgo alto o moderado tienen un riesgo de hospitalización bajo (0,5 %). La mayoría de las personas pertenecen a la categoría de riesgo bajo.

7.1. Tratamientos contra el COVID-19 en el caso de las personas que no presentan un cuadro grave de COVID-19

La OMS sigue recomendando encarecidamente la combinación de nirmatrelvir y ritonavir (Paxlovid) para las personas con riesgo de hospitalización alto y moderado. Las recomendaciones indican que la combinación de nirmatrelvir y ritonavir se considera la mejor opción para la mayoría de los pacientes que cumplen con los requisitos, en vista de sus beneficios terapéuticos, la facilidad de administración y que existen menos motivos de preocupación acerca de posibles daños. La OMS recomendó por primera vez la combinación de nirmatrelvir y ritonavir en abril de 2022.

Si la combinación de nirmatrelvir y ritonavir no está disponible para los pacientes con riesgo de hospitalización alto, la OMS sugiere recurrir en su lugar a molnupiravir o a remdesivir. La OMS desaconseja el uso de molnupiravir y de remdesivir en pacientes con riesgo moderado, ya que considera que los daños potenciales superan los beneficios limitados en los pacientes con riesgo de ingreso hospitalario moderado. Para las personas con riesgo de hospitalización bajo, no recomienda ningún tratamiento antivírico. Síntomas como la fiebre y el dolor pueden seguir tratándose con analgésicos, como el paracetamol.

8. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS MEDICAMENTOS PARA PACIENTES CON COVID-19 EN ESPAÑA

En estos momentos hay una limitada disponibilidad de las nuevas alternativas terapéuticas antivirales frente a la infección por SARS-CoV-2. Esto hace necesario establecer unos criterios de priorización en el acceso precoz a los mismos. La accesibilidad a los tratamientos disponibles se ha priorizado considerando aspectos como la gravedad y/o el riesgo de complicaciones, la respuesta a los tratamientos disponibles, y el beneficio esperable.

Para el tratamiento de la enfermedad leve (sin requerimiento de oxigenoterapia) y con el objetivo de evitar la progresión a enfermedad grave en pacientes con factores de riesgo, se dispone en la actualidad de los siguientes antivirales y anticuerpos monoclonales para el tratamiento del COVID-19 leve:

— Antivirales:
  • Veklury® (remdesivir)
  • Paxlovid® (nirmatrelvir/ritonavir)
  • Lagevrio® (molnupiravir)
— Anticuerpos monoclonales:
  • Ronapreve® (casirivimab/imdevimab)
  • Xevudy® (sotrovimab)
  • Evusheld® (cilgavimab/tixagevimab)

Actualmente, molnupiravir (Lagevrio®) no se encuentra disponible para su uso en España. Recibió una evaluación negativa por la EMA el 23 de febrero de 2023, recomendando la no autorización de su comercialización. Aunque no está recomendado por la EMA, la OMS lo mantiene con una «recomendación débil» para pacientes con COVID-19 no grave confirmado con mayor riesgo de hospitalización, con síntomas de menos de 5 días; y

cuando las opciones de tratamiento alternativas no son accesibles o clínicamente apropiadas.

8.1. Ronapreve® (Casirivimab/imdevimab)

Ronapreve está indicado para la prevención y el tratamiento de enfermedad por COVID-19 en pacientes adultos y adolescentes de 12 años y mayores con un peso corporal de al menos 40 kg, que no requieran suplemento de oxígeno y que tengan mayor riesgo de progresar a COVID-19 grave. Datos *in vitro* actualizados, muestran que Ronapreve tiene una actividad reducida frente a la variante Ómicron. La decisión sobre el uso de Ronapreve debe tener en cuenta lo que se conoce sobre las características de los virus del SARS-CoV-2 circulantes y la información disponible sobre los patrones de sensibilidad a Ronapreve.

8.2. Xevudy® (Sotrovimab)

Sotrovimab está indicado en el tratamiento del COVID-19 en adultos y adolescentes que no requieren oxígeno suplementario y que tienen un mayor riesgo de progresar a estadios más graves de la enfermedad.

La eficacia y seguridad de sotrovimab han sido evaluadas en adultos no vacunados con menos de 5 días de síntomas, que muestra que el tratamiento intravenoso con sotrovimab resultó en una reducción del 79 % (reducción del riesgo relativo ajustado) en las hospitalizaciones por cualquier causa durante más de 24 horas o muerte por cualquier causa el día 29 en comparación con placebo. En los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, sotrovimab ha sido bien tolerado. Las reacciones adversas más frecuentes son la hipersensibilidad y las reacciones relacionadas con la infusión, que se observan en aproximadamente el 2 % y el 1 % de los casos, respectivamente. La evidencia del uso de sotrovimab en paciente con inmunosupresión de alto riesgo es muy limitada y se trata de un uso fuera de indicación. Datos *in vitro* actualizados, muestran que sotrovimab mantiene su actividad frente a todas las variantes probadas de preocupación e interés del SARS-CoV-2.

8.3. Veklury® (Remdesivir)

Veklury® está autorizado para el tratamiento de la enfermedad COVID-19 en adultos y adolescentes (de 12 años y mayores con peso corporal de al menos 40 kg) con neumonía que requieren oxígeno suplementario (oxígeno de alto o bajo flujo u otra ventilación no invasiva al inicio del tratamiento). Asimismo, también está indicado en adultos que no requieren oxígeno suplementario y que presentan un riesgo más alto de evolucionar a COVID-19 grave.

8.4. Lagevrio® (Molnupiravir)

La EMA no recomienda el uso de molnupiravir para el tratamiento de COVID-19. El medicamento, que actualmente está autorizado en la UE, se puede usar para tratar a adultos con COVID-19 no grave confirmado que no requieren oxígeno suplementario y que tienen un mayor riesgo de desarrollar COVID-19 grave, y cuando las opciones de tratamiento alternativas no son accesibles o clínicamente apropiadas.

Para la mayoría de los pacientes con COVID-19 no grave, se preferirá nirmatrelvir/ritonavir debido a su mayor eficacia y comodidad de la dosis oral. Sin embargo, habrá circunstancias en las que no se deba utilizar nirmatrelvir-ritonavir debido a posibles interacciones farmacológicas con otros medicamentos que estén siendo utilizados. En estos pacientes, el sotrovimab sería la opción preferida. Si el sotrovimab no está disponible, el remdesivir es una opción razonable. La principal ventaja del remdesivir es un mayor suministro del fármaco en este momento. Su principal desventaja es la necesidad de una infusión intravenosa durante 3 días consecutivos. El remdesivir es especialmente adecuado para su uso en pacientes que ya se encuentre en un entorno sanitario. Si ninguna de las otras opciones es accesible o apropiada, puede prescribirse molnupiravir con las limitaciones y precauciones indicadas.

9. CONSIDERACIONES SOBRE EL USO DE MEDICAMENTOS CONCOMITANTES EN PACIENTES CON COVID-19

Las personas con afecciones médicas subyacentes, como enfermedades cardiovasculares, pulmonares, diabetes, neoplasias malignas y los que reciben tratamiento inmunosupresor crónico corren mayor riesgo de padecer una enfermedad grave con COVID-19. A estos pacientes se les suelen recetar medicamentos para tratar sus enfermedades subyacentes. Pacientes con COVID-19 que reciben medicación concomitante (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA), inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas), corticosteroides sistémicos o inhalados, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antihistamínicos H2) para enfermedades subyacentes no deben interrumpir estos medicamentos durante el tratamiento agudo de COVID-19. En la actualidad, no existen pruebas de que la interrupción de la medicación para las afecciones médicas subyacentes ofrezca un beneficio clínico para los pacientes con COVID-19. Al prescribir medicamentos para tratar el COVID-19, siempre se debe evaluar la medicación actual del paciente para detectar posibles interacciones medicamentosas y/o efectos

adversos aditivos. La decisión de continuar o cambiar la medicación de un paciente debe individualizarse en función de su estado clínico específico.

10. ORIENTACIONES FUTURAS

El desarrollo de una terapia antiviral eficaz contra el SARS-CoV-2 sigue siendo fundamental para los que están a la espera de la vacunación, así como para los millones de personas inmunodeprimidas que se calcula que no pueden responder de forma sólida a la vacunación. Además, la continua aparición y propagación de variantes y subvariantes que escapan al sistema inmunitario significa que incluso las personas inmunocompetentes probablemente tengan tasas de fracaso de la vacuna más altas que las observadas en los ensayos clínicos realizados en los primeros momentos de la pandemia. Estudios realizados en individuos no vacunados antes de la aparición de la variante Ómicron, sugieren que las terapias antivirales dirigidas a las proteínas virales conservadas sean eficaces contra los futuros coronavirus pandémicos, así como que el beneficio del tratamiento sea menor entre los pacientes que no tienen un alto riesgo de progresión a enfermedad grave.

Hasta la fecha, las terapias se han evaluado como agentes únicos, y existe la preocupación de que pueda surgir una resistencia viral, especialmente entre los pacientes gravemente inmunodeprimidos que pueden tener una replicación prolongada del SARS-CoV-2. Una consideración especial es que SARS-CoV-2 es un virus con una alta tasa de mutación, lo que plantea la posibilidad de que la actividad neutralizante de los anticuerpos puede reducirse sustancialmente ante las variantes y las mutaciones virales. Esa ha sido la razón por la que ya no se recomienda el uso como monoterapia de algunos anticuerpos monoclonales, como bamlanivimab. En esas condiciones, la combinación de dos anticuerpos monoclonales, dirigidos a dos dominios distintos de ligando, puede aumentar su potencia y reducir el riesgo de fallo terapéutico y de resistencia por las variantes y mutaciones del virus. Este concepto se sustenta en que es poco probable que una mutación en la proteína S afecte también la eficacia de ambos anticuerpos. Es necesario vigilar la aparición de resistencias entre los pacientes que reciben monoterapias junto con ensayos para evaluar las combinaciones farmacológicas. Por otra parte, dado que las terapias antivirales son más eficaces cuando se utilizan de forma temprana, debe ampliarse el acceso a las pruebas de detección del SARS-CoV-2 junto con sistemas para ofrecer rápidamente el tratamiento. Finalmente, la necesidad de un enfoque global es evidente para las vacunas, pero también debería serlo para el diagnóstico y la terapéutica.

CONCLUSIONES

Desde su descubrimiento a finales de 2019 como nuevo coronavirus patogénico, el virus SARS-CoV-2 está lejos de ser derrotado. Entre los logros más importantes alcanzados durante los años de pandemia y era pos-COVID-19 se encuentra la identificación/caracterización de dianas basadas en SARS-CoV-2, como la glicoproteína de espiga (S), la ARN polimerasa (RdRp), la proteasa 3-chymotrypsin-like (3CLpro) y la proteasa tipo papaína (PLpro). Al mismo tiempo se han diseñado (o reutilizado) varios medicamentos, como vacunas, fármacos inmunodepresores y anticuerpos monoclonales frente a estas proteínas víricas estructurales y no estructurales del SARS-CoV-2, algunos de ellos actualmente autorizados para el tratamiento de pacientes con COVID-19. La profilaxis con vacunas contra el SARS-CoV-2 está teniendo un impacto sustancial en las hospitalizaciones y la mortalidad. No obstante, incluso en vacunados, sigue habiendo dudas sobre la duración de la protección a pesar de los avances significativos en el campo de las nuevas vacunas contra el COVID-19. Sigue existiendo una necesidad urgente de vacunas seguras y eficaces contra las variantes y subvariantes emergentes del SARS-CoV-2, así como de tratamientos orales anti-COVID-19 que puedan prevenir la progresión de la infección y reducir la tasa de transmisión y mortalidad que ha cobrado hasta ahora casi 7 millones de vidas. En conjunto, sigue siendo necesario mejorar la eficacia de las vacunas contra el COVID-19 y necesidad de fármacos más eficaces para su prevención y tratamiento. La pandemia ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de orientaciones fiables, accesibles y actualizadas periódicamente para contextualizar los nuevos hallazgos y ofrecer recomendaciones para la práctica clínica.

BIBLIOGRAFÍA

ABDELNABI, R., FOO, C.S., DE JONGHE, S. *et al.* (2021), Molnupiravir Inhibits Replication of the Emerging SARS-CoV-2 Variants of Concern in a Hamster Infection Model. Journal of Infectious Diseases 224: 749-753.

ABRAMOWICZ, M., ZUCCOTTI, G. & PFLOMM, J.M. (2022), Tixagevimab and Cilgavimab (Evusheld) for Pre-Exposure Prophylaxis of COVID-19. JAMA 327 (4): 384-385.

AGARWAL, A., ROCHWERG, B., LAMONTAGNE, F. *et al.* (2020), A Living WHO Guideline on Drugs for COVID-19. BMJ 370:m3379.

ALHUMAID, S., MUTAIR, A.A., ALAWI, Z.A. *et al.* (2020), Efficacy and Safety of Lopinavir/Ritonavir for Treatment of COVID-19: A Systematic Review and

Meta-Analysis. Tropical Medicine and Infectious Disease 5(4): 180.

BAUM, A., AJITHDOSS, D., COPIN, R. *et al.* (2020), REGN-COV2 Antibodies Prevent and Treat SARS-CoV-2 Infection in Rhesus Macaques and Hamsters. Science 370(6520): 1110-1115.

BEIGEL, J.H., TOMASHEK, K.M., DODD, L.E. *et al.* (2020), ACTT-1 Study Group Members. Remdesivir for the Treatment of COVID-19 – Final Report. New England Journal of Medicine 383(19): 1813-1826.

BUTLER, C.C., HOBBS, F.D.R., GBINIGIE, O.A. *et al.* PANORAMIC Trial Collaborative Group (2023), Molnupiravir plus Usual Care versus Usual Care Alone as Early Treatment for Adults with COVID-19 at Increased Risk of Adverse Outcomes (PANORAMIC): an Open-Label, Platform-Adaptive Randomised Controlled Trial. The Lancet 401(10373): 281-293.

CAVALLI, G., FARINA, N., CAMPOCHIARO, C. *et al.* (2020), Repurposing of Biologic and Targeted Synthetic Anti-Rheumatic Drugs in COVID-19 and Hyper-Inflammation: A Comprehensive Review of Available and Emerging Evidence at the Peak of the Pandemic. Frontiers in Pharmacology 11: 598308.

CALY, L., DRUCE, J.D., CATTON, M.G. *et al.* (2020), The FDA-Approved Drug Ivermectin Inhibits the Replication of SARS-CoV-2 In Vitro. Antiviral Research 178: 104787.

CAMERONI, E., BOWEN, J.E., ROSEN, L.E. *et al.* (2022), Broadly Neutralizing Antibodies Overcome SARS-CoV-2 Omicron Antigenic Shift. Nature 602: 664-670.

CAO, Y., WEI, J., ZOU, L. *et al.* (2020a), Ruxolitinib in Treatment of Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Multicenter, Single-Blind, Randomized Controlled Trial. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2020a; 146(1): 137-146.

CAO, B., WANG, Y., WEN, D. *et al.* (2020b), A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe COVID-19. New England Journal of Medicine 2020b; 382: 1787-1799.

CARABELLI, A.M., PEACOCK, T.P., THORNE, L.G. *et al.* (2023), SARS-CoV-2 Variant Biology: Immune Escape, Transmission and Fitness. Nature Review Microbiology 21, 162-177.

CATHCART, A.L., HAVENAR-DAUGHTON, C., LEMPP, F.A. *et al.* (2021), The Dual Function Monoclonal Antibodies VIR-7831 and VIR-7832 Demonstrate Potent In Vitro and In Vivo Activity against SARS-CoV-2. bioRxiv. 2021; DOI: 10.1101/2021.03.09.434607.

CAVALCANTI, A.B., ZAMPIERI, F.G., ROSA, R.G. *et al.* (2020), Coalition COVID-19 Brazil I Investigators. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate COVID-19. New England Journal of Medicine 383(21): 2041-2052.

CCAES (2023), Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/COVID19_Actualizacion_variantes_20230703

CHAQROUN, A., HARTARD, C. & SCHVOERER, E. (2021), Anti-SARS-CoV-2 Vaccines and Monoclonal Antibodies Facing Viral Variants. Viruses 13(6): 1171.

CHEN, P., NIRULA, A., HELLER, B. *et al.* (2021), BLAZE-1 Investigators. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with COVID-19. New England Journal of Medicine 21; 384(3): 229-237.

COHEN, M.S., NIRULA, A., MULLIGAN, M.J. *et al.* (2021), Effect of Bamlanivimab vs Placebo on Incidence of COVID-19 among Residents and Staff of Skilled Nursing and Assisted Living Facilities: A Randomized Clinical Trial. JAMA 6; 326(1): 46-55.

CONTI, P., RONCONI, G., CARAFFA, A. *et al.* (2020), Induction of Pro-Inflammatory Cytokines (IL-1 and IL-6) and Lung Inflammation by Coronavirus-19 (COVID-19 or SARS-CoV-2): Anti-Inflammatory Strategies. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents 34(2): 327-331.

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (2020), The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-nCoV and Naming It SARS-CoV-2. Nature Microbiology 5(4): 536-544.

DAVOUDI-MONFARED, E., RAHMANI, H., KHALILI, H. *et al.* (2020), A Randomized Clinical Trial of the Efficacy and Safety of Interferon β-1a in Treatment of Severe COVID-19. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 64(9): e01061-20.

DOUGAN, M., AZIZAD, M., MOCHERLA, B. *et al.* (2022), BLAZE-1 Investigators. A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial of Bamlanivimab and Etesevimab Together in High-Risk Ambulatory Patients with COVID-19 and Validation of the Prognostic Value of Persistently High Viral Load. Clinical Infectious Diseases 75(1): e440-e449.

FANLO, P., GRACIA-TELLO, B.D.C., FONSECA AIZPURU, E. *et al.* (2023), Efficacy and Safety of Anakinra plus Standard of Care for Patients with Severe COVID-19: A Randomized Phase 2/3 Clinical Trial. GEAS-SEMI Group. JAMA Network Open 6(4): e237243.

FISCHER, W., ERON, J.J., HOLMAN, W. *et al.* (2022), Molnupiravir, an Oral Antiviral Treatment for COVID-19. Science Translational Medicine 14(628): eabl7430.

FDA (2023), Updated COVID-19 Vaccines for Use in the United States Beginning in Fall 2023.

FOCOSI, D. & MAGGI, F. (2021), Neutralising Antibody Escape of SARS-CoV-2 Spike Protein: Risk Assessment for Antibody-Based Covid-19 Therapeutics and Vaccines. Reviews in Medical Virology 31(6): e2231.

FREILICH, D., VICTORY, J. & GADOMSKI, A. (2022), Hydroxychloroquine/Chloroquine in COVID-19 with Focus on Hospitalized Patients – A Systematic Review. medRxiv 2022; 01.11.22269069; DOI: doi.org/10.1101/2022.01.11.22269069

FURUTA, Y., GOWEN, B.B., TAKAHASHI, K. *et al.* (2013), Favipiravir (T-705), a Novel Viral RNA Polymerase Inhibitor. Antiviral Research 100(2): 446-454.

GANDHI, R.T., MALANI, P.N. & DEL RIO, C. (2022), COVID-19 Therapeutics for Nonhospitalized Patients. JAMA 327(7): 617-618.

GIOVANETTI, M., BENEDETTI, F., CAMPISI, G. *et al.* (2021), Evolution Patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on Its Genome Variants. Biochemical and Biophysical Research Communications 29; 538: 88-91.

GORDON, A.C., MOUNCEY, P.R., AL-BEIDH, F. *et al.* (2021), REMAP-CAP Investigators. Interleukin-6 Receptor Antagonists in Critically Ill Patients with COVID-19. New England Journal of Medicine 384(16): 1491-1502.

GHOSN, L., ASSI, R., EVRENOGLOU, T. *et al.* (2023), Interleukin-6 Blocking Agents for Treating COVID-19: A Living Systematic Review. Cochrane Database of Systematic Reviews 2023, Issue 6. Art. No.: CD013881.

GOTTLIEB, R.L., NIRULA, A., CHEN, P. *et al.* (2021), Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination with Etesevimab on Viral Load in Patients with Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. JAMA 325(7): 632-644.

GOTTLIEB, R.L., VACA, C.E., PAREDES, R. *et al.* (2022), GS-US-540-9012 (PINETREE) Investigators. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe COVID-19 in Outpatients. New England Journal of Medicine 386(4): 305-315.

GREANEY, A.J., LOES, A.N., CRAWFORD, K.H.D. *et al.* (2021), Comprehensive Mapping of Mutations in the SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain that Affect Recognition by Polyclonal Human Plasma Antibodies. Cell Host Microbe 29(3): 463-476.

GUIMARÃES, P.O., QUIRK, D., FURTADO, R.H. *et al.* (2021), STOP-COVID Trial Investigators. Tofacitinib in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. New England Journal of Medicine 385(5): 406-415.

GUPTA, A., GONZALEZ-ROJAS, Y., JUAREZ, E. *et al.* (2021b), COMET-ICE Investigators. Early Treatment for COVID-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. New England Journal of Medicine 385(21): 1941-1950.

HAMMOND, J., LEISTER-TEBBE, H., GARDNER, A. *et al.* (2022), EPIC-HR Investigators. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with COVID-19. New England Journal of Medicine 386: 1397-1408.

HAN, Q., GUO, M., ZHENG, Y. *et al.* (2020), Current Evidence of Interleukin-6 Signaling Inhibitors in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. Frontiers in Pharmacology 11: 615972.

HE, X., LAU, E.H.Y., WU, P. *et al.* (2020), Temporal Dynamics in Viral Shedding and Transmissibility of COVID-19. Nature Medicine 26(5): 672-675.

HE, X., HONG, W., PAN, X. *et al.* (2021), SARS-CoV-2 Omicron Variant: Characteristics and Prevention. Med Communications 2(4): 838-845.

HEIDARY, F. & GHAREBAGHI, R. (2020), Ivermectin: A Systematic Review from Antiviral Effects to COVID-19 Complementary Regimen. Journal of Antibiotics 73(9): 593-602.

HOFFMANN, M., KLEINE-WEBER, H., SCHROEDER, S. *et al.* (2020), SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell 181 (2): 271-280.

HOU, Y.J., OKUDA, K., EDWARDS, C.E. *et al.* (2020), SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. Cell 182(2): 429-446.

HORBY, P., LIM, W.S., EMBERSON, J.R. *et al.* (2021), RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with COVID-19. New England Journal of Medicine 384(8): 693-704.

HUANG, C., WANG, Y., LI, X. *et al.* (2020a), Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. The Lancet 395: 497-506.

HUANG, Y., CHEN, S., YANG, Z. *et al.* (2020b), SARS-CoV-2 Viral Load in Clinical Samples from Critically Ill Patients. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 201(11): 1435-1438.

IKETANI, S., LIU, L., GUO, Y. *et al.* (2022), Antibody Evasion Properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. Nature 604: 553-556.

JANG, Y.R., OH, Y.J. & KIM, J.Y. (2023), Regdanvimab for Patients with Mild-to-Moderate COVID-19: A Retrospective Cohort Study and Subgroup Analysis of Patients with the Delta Variant. International Journal of Infectious Diseases 130, 94-100.

JAYK BERNAL, A., GOMES DA SILVA, M.M., MUSUNGAIE, D.B. *et al.* (2022), MOVe-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of COVID-19 in Nonhospitalized Patients. New England Journal of Medicine 386(6): 509-520.

JONES, B.E., BROWN-AUGSBURGER, P.L., CORBETT, K.S. *et al.* (2021), The Neutralizing Antibody, LY-CoV555, Protects against SARS-CoV-2 Infection in

Nonhuman Primates. Science Translational Medicine 13: eabf1906.

JOYNER, M.J., BRUNO, K.A., KLASSEN, S.A. *et al.* (2020), Safety Update: COVID-19 Convalescent Plasma in 20,000 Hospitalized Patients. Mayo Clinical Proceedings 95(9): 1888-1897.

KALIL, A.C., PATTERSON, T.F., MEHTA, A.K. *et al.* (2021), ACTT-2 Study Group Members. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with COVID-19. New England Journal of Medicine 384(9): 795-807.

KARIM, S.S.A. & KARIM, Q.A. (2021), Omicron SARS-CoV-2 Variant: A New Chapter in the COVID-19 Pandemic. The Lancet 398(10317): 2126-2128.

KAWAMURA, K., ICHIKAD, K., TAKAKI, M. *et al.* (2018), Adjunctive Therapy with Azithromycin for Moderate and Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: A Retrospective, Propensity Score-Matching Analysis of Prospectively Collected Data at a Single Center. International Journal of Antimicrobial Agents 51(6): 918-924.

KIM, C., RYU, D.K., LEE, J. *et al.* (2021), A Therapeutic Neutralizing Antibody Targeting Receptor Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein. Nature Communications 12 (1): 288.

KOKIC, G., HILLEN, H.S., TEGUNOV, D. *et al.* (2021), Mechanism of SARS-CoV-2 Polymerase Stalling by Remdesivir. Nature Communications 12(1): 279.

KORBER, B., FISCHER, W.M., GNANAKARAN, S. *et al.* (2020), Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. Cell 182(4): 812-827.

KRAUSE, P.R. *et al.* (2021), SARS-CoV-2 Variants and Vaccines. New England Journal of Medicine 385: 179-186.

KYRIAZOPOULOU, E., POULAKOU, G., MILIONIS, H. *et al.* (2021), Early Treatment of COVID-19 with Anakinra Guided by Soluble Urokinase Plasminogen Receptor Plasma Levels: A Double-Blind, Randomized Controlled Phase 3 Trial. Nature Medicine 27(10): 1752-1760.

LEE, C.M., PARK, S.W. & LEE, E. (2022), Early Oxygen Requirement in Patients with Mild-to-Moderate COVID-19 Who Received Regdanvimab after Delta-Variant Outbreak. Infection and Chemotherapy 54 (2): 258-265.

LEE, J.Y., LEE, J.Y., KO, J.H. *et al.* (2021), Effectiveness of Regdanvimab Treatment in High-Risk COVID-19 Patients to Prevent Progression to Severe Disease. Frontiers in Immunology 12: 772320.

LEMPP, F.A., SORIAGA, L.B., MONTIEL-RUIZ, M. *et al.* (2021), Lectins Enhance SARS-CoV-2 Infection and Influence Neutralizing Antibodies. Nature 598(7880): 342-347.

LESCURE, F.X., HONDA, H., FOWLER, R.A. *et al.* (2021), Sarilumab COVID-19 Global Study 19: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. The Lancet Respiratory Medicine 9(5): 522-532.

LI, C., YANG, Y. & REN, L. (2020), Genetic Evolution Analysis of 2019 Novel Coronavirus and Coronavirus from Other Species. Infection, Genetics and Evolution 82: 104285.

LIU, H., WEI, P., ZHANG, Q. *et al.* (2021), 501Y.V2 and 501Y.V3 Variants of SARS-CoV-2 Lose Binding to Bamlanivimab In Vitro. Monoclonal antibodies (mAbs) 13(1): 1919285.

LÓPEZ-MEDINA, E., LÓPEZ, P., HURTADO, I.C. *et al.* (2021), Effect of Ivermectin on Time to Resolution of Symptoms among Adults with Mild COVID-19: A Randomized Clinical Trial. JAMA 325(14): 1426-1435.

LU, R., ZHAO, X., LI, J., NIU, P. *et al.* (2020), Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding. The Lancet 395 (10224): 565-574.

LUNDGREN, J.D., GRUND, B., BARKAUSKAS, C.E. *et al.* (2021), ACTIV-3/TICO LY-CoV555 Study Group, A Neutralizing Monoclonal Antibody for Hospitalized Patients with COVID-19. New England Journal of Medicine 384(10): 905-914.

MAHASE, E. (2021), COVID-19: Pfizer's Paxlovid is 89% Effective in Patients at Risk of Serious Illness, Company Reports. BMJ 375:n2713.

MAIR-JENKINS, J., SAAVEDRA-CAMPOS, M., BAILLIE, J.K. *et al.* (2015), Convalescent Plasma Study Group. The Effectiveness of Convalescent Plasma and Hyperimmune Immunoglobulin for the Treatment of Severe Acute Respiratory Infections of Viral Etiology: A Systematic Review and Exploratory Meta-Analysis. Journal of Infectious Diseases 211(1): 80-90.

MALONE, B. & CAMPBELL, E.A. (2021), Molnupiravir: Coding for Catastrophe. Nature Structural and Molecular Biology 28: 706-708.

MANGKULIGUNA, G., GLENARDI, N. & PRAMONO, L.A. (2021), Efficacy and Safety of Azithromycin for the Treatment of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. Tuberculosis and Respiratory Diseases (Seoul). 2021; 84(4): 299-316.

MATHESON, N.J. & LEHNER, P.J. (2020), How Does SARS-CoV-2 cause COVID-19? Science. 369(6503): 510-511.

MEHTA, P., MCAULEY, D.F., BROWN, M. *et al.* (2020), Across Specialty Collaboration, UK. COVID-19: Consider Cytokine Storm Syndromes and Immunosuppression. The Lancet. 395(10229): 1033-1034.

MITJÀ, O., CORBACHO-MONNÉ, M., UBALS, M. *et al.* (2021), BCN-PEP-CoV2 Research Group. A Cluster-Randomized Trial of Hydroxychloroquine for

Prevention of COVID-19. New England Journal of Medicine 384(5): 417-427.

MIYAZAKI, T., HOSOGAYA, N., FUKUSHIGE, Y. *et al.* A (2023), Multicenter Randomized Controlled Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Nelfinavir in Patients with Mild COVID-19. Microbiology Spectrum 11(3): e0431122.

MONK, P.D., MARSDEN, R.J., TEAR, V.J. *et al.* (2021), Inhaled Interferon Beta COVID-19 Study Group. Safety and Efficacy of Inhaled Nebulised Interferon Beta-1a (SNG001) for Treatment of SARS-CoV-2 Infection: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. The Lancet Respiratory Medicine 9(2): 196-206.

MUSARRAT, F., CHOULJENKO, V., DAHAL, A. *et al.* (2020), The Anti-HIV Drug Nelfinavir Mesylate (Viracept) Is a Potent Inhibitor of Cell Fusion Caused by the SARS-CoV-2 Spike (S) Glycoprotein Warranting Further Evaluation as an Antiviral against COVID-19 Infections. Journal of Medical Virology 92(10): 2087-2095.

NHAM, E., KO, J.H., SONG, K. *et al.* (2022a), Kinetics of Vaccine-Induced Neutralizing Antibody Titers and Estimated Protective Immunity against Wild-Type SARS-CoV-2 and the Delta Variant: A Prospective Nationwide Cohort Study Comparing Three COVID-19 Vaccination Protocols in South Korea. Frontiers in Immunology 13 (2022), 968105.

O'BRIEN, M.P., NETO, E.F., CHEN, K.C. *et al.* (2021), Casirivimab with Imdevimab Antibody Cocktail for COVID-19 Prevention: Interim Results. Topics in Antiviral Medicine 29(1): 33-34.

ORTIGOZA, M.B., YOON, H., GOLDFELD, K.S. *et al.* (2022), Efficacy and safety of COVID-19 Convalescent Plasma in Hospitalized Patients: A Randomized Clinical Trial. JAMA Internal Medicine 182(2): 115-126.

OWEN, D.R., ALLERTON, C.M.N., ANDERSON, A.S. *et al.* (2021), An Oral SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor Clinical Candidate for the Treatment of COVID-19. Science. 2021; 374(6575): 1586-1593.

ÖZLÜŞEN, B., KOZAN, Ş., AKCAN, R.E. *et al.* (2021), Effectiveness of Favipiravir in COVID-19: A Live Systematic Review. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2021; 40(12): 2575-2583.

PAINTER, W.P., HOLMAN, W., BUSH, J.A. *et al.* (2021), Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity against SARS-CoV-2. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 65(5): e02428-20.

PAN, H., PETO, R., HENAO-RESTREPO, A.M. *et al.* (2021), Repurposed Antiviral Drugs for COVID-19 – Interim WHO Solidarity Trial Results. New England Journal of Medicine 384(6): 497-511.

PARK, M., COOK, A.R., LIM, J.T. *et al.* (2020), A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. Journal of Clinical Medicine 9(4): 967.

PATEL, N., TROST, J.F., GUEBRE-XABIER, M. *et al.* (2023), XBB.1.5 Spike Protein COVID-19 Vaccine Induces Broadly Neutralizing and Cellular Immune Responses against EG.5.1 and Emerging XBB Variants. Scientific Reports 13: 19176.

PAULES, C.I., MARSTON, H.D. & FAUCI, A.S. (2020), Coronavirus Infections-More than Just the Common Cold. JAMA 323(8): 707-708.

PEERSEN, O.B. (2019), A Comprehensive Superposition of Viral Polymerase Structures. Viruses 11(8): 745.

PERAZZOLO, S., ZHU, L., LIN, W. *et al.* (2021), Systems and Clinical Pharmacology of COVID-19 Therapeutic Candidates: A Clinical and Translational Medicine Perspective. Journal of Pharmaceutical Sciences 110: 1002-1017.

PILLAIYAR, T., MANICKAM, M., NAMASIVAYAM, V. *et al.* (2016), An Overview of Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus (SARS-CoV) 3CL Protease Inhibitors: Peptidomimetics and Small Molecule Chemotherapy. Journal of Medicinal Chemistry 59(14): 6595-6628.

PINTO, D., PARK, Y.J., BELTRAMELLO, M. *et al.* (2020), Cross-Neutralization of SARS-CoV-2 by a Human Monoclonal SARS-CoV Antibody. Nature 583(7815): 290-295.

PLANAS, D., SAUNDERS, N., MAES, P. *et al.* (2022), Considerable Escape of SARS-CoV-2 Omicron to Antibody Neutralization. Nature 602(7898): 671-675.

PLANAS, D., VEYER, D., BAIDALIUK, A. *et al.* (2021), Reduced Sensitivity of SARS-CoV-2 Variant Delta to Antibody Neutralization. Nature 596(7871): 276-280.

PRINCE, T., DONOVAN-BANFIELD, I., GOLDSWAIN, H. *et al.* Antiviral Activity of Molnupiravir Precursor NHC against Variants of Concern (VOCs) and Its Therapeutic Window in a Human Lung Cell Model. bioRxiv 2021. DOI: 10.1101/2021.11.23.469695.

RAJTER, J.C., SHERMAN, M.S., FATTEH, N. *et al.* (2021), Use of Ivermectin Is Associated with Lower Mortality in Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. Chest 159(1): 85-92.

RANIERI, V.M., PETTILÄ, V., KARVONEN, M.K. *et al.* (2020), INTEREST Study Group. Effect of Intravenous Interferon β-1a on Death and Days Free from Mechanical Ventilation among Patients with Moderate to Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Clinical Trial. JAMA 323(8): 725-733.

RAYBOULD, M.I.J., KOVALTSUK, A., MARKS, C. *et al.* (2021), CoV-AbDab: The Coronavirus Antibody Database. Bioinformatics 37(5): 734-735.

RECOVERY Collaborative Group (2020), Lopinavir-Ritonavir in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. Lancet 396: 1345-1352.

RECOVERY Collaborative Group (2021), Convalescent Plasma in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. Lancet 397(10289): 2049-2059.

ROCKETT, R., BASILE, K., MADDOCKS, S. *et al.* (2022), Resistance Mutations in SARS-CoV-2 Delta Variant after Sotrovimab Use. New England Journal of Medicine 386: 1477-1479.

ROSAS, I.O., BRÄU, N., WATERS, M. *et al.* (2021), Tocilizumab in Hospitalized Patients with Severe COVID-19 Pneumonia. New England Journal of Medicine 384(16): 1503-1516.

ROSCHEWSKI, M., LIONAKIS, M.S., SHARMAN, J.P. *et al.* (2020), Inhibition of Bruton Tyrosine Kinase in Patients with Severe COVID-19. Science Immunology 5(48): eabd0110.

RYU, D.K., KANG, B., NOH, H. *et al.* (2021), The In Vitro and In Vivo Efficacy of CT-P59 against Gamma, Delta and Its Associated Variants of SARS-CoV-2. Biochemical and Biophysical Research Communications 578: 91-96.

SHAKOORY, B., CARCILLO, J.A., CHATHAM, W.W. *et al.* (2016), Interleukin-1 Receptor Blockade Is Associated with Reduced Mortality in Sepsis Patients with Features of Macrophage Activation Syndrome: Reanalysis of a Prior Phase III Trial. Critical Care Medicine 44(2): 275-281.

SHEAHAN, T.P., SIMS, A.C., ZHOU, S. *et al.* (2020), An Orally Bioavailable Broad-Spectrum Antiviral Inhibits SARS-CoV-2 in Human Airway Epithelial Cell Cultures and Multiple Coronaviruses in Mice. Science Translational Medicine 12(541): eabb5883.

SIMONOVICH, V.A., BURGOS PRATX, L.D., SCIBONA, P. *et al.* (2021), PlasmAr Study Group. A Randomized Trial of Convalescent Plasma in COVID-19 Severe Pneumonia. New England Journal of Medicine 384(7): 619-629.

SINGH, A.K., SINGH, A., SINGH, R. *et al.* (2021), Molnupiravir in COVID-19: A Systematic Review of Literature. Diabetes Metabolic Syndrome 15(6): 102329.

SONG, Z., XU, Y., BAO, L. *et al.* (2019), From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. Viruses 11: 59.

SPINNER, C.D., GOTTLIEB, R.L., CRINER, G.J. *et al.* (2020), GS-US-540-5774 Investigators. Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients with Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. JAMA 324(11): 1048-1057.

STEBBING, J., PHELAN, A., GRIFFIN, I. *et al.* (2020), COVID-19: Combining Antiviral and Anti-Inflammatory Treatments. The Lancet Infectious Diseases 2020; 20(4): 400-402.

STEFANO, L.D., OGBURN, E.L., RAM, M. *et al.* (2022), Hydroxychloroquine/Chloroquine for the Treatment of Hospitalized Patients with COVID-19: An Individual Participant Data Meta-Analysis. Plos One 17(9): e0273526.

STONE, J.H., FRIGAULT, M.J., SERLING-BOYD, N.J. *et al.* (2020), BACC Bay Tocilizumab Trial Investigators. Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with COVID-19. New England Journal of Medicine 383(24): 2333-2344.

STREINU-CERCEL, A., SĂNDULESCU, O., PREOTESCU, L.L. *et al.* (2022), Efficacy and Safety of Regdanvimab (CT-P59): A Phase 2/3 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Outpatients with Mild-to-Moderate Coronavirus Disease 2019. Open Forum Infectious Diseases 9 (4), ofac053.

SYED, Y.Y. (2021), Regdanvimab: First Approval. Drugs 81 (18): 2133-2137.

VANBLARGAN, L.A., ERRICO, J.M., HALFMANN, P.J. *et al.* (2022), An Infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron Virus Escapes Neutralization by Therapeutic Monoclonal Antibodies. Nature Medicine 28 (3): 490-495.

VANGEEL, L., DE JONGHE, S., PIET MAES, P. *et al.* (2022), Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir Remain Active against SARS-CoV-2 Omicron and Other Variants of Concern. Antiviral Research198: 105252.

WALKER, P.J., SIDDELL, S.G., LEFKOWITZ, E.J. *et al.* (2021), Changes to Virus Taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature Ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology 166(9): 2633-2648.

WANG, H., PAULSON, K.R., PEASE, S.A. *et al.* (2022), Estimating Excess Mortality Due to the COVID-19 Pandemic: A Systematic Analysis of COVID-19-Related Mortality, 2020-21. The Lancet 399(10334): 1513-1536.

WANG, M., CAO, R., ZHANG, L. *et al.* (2020a), Remdesivir and Chloroquine Effectively Inhibit the Recently Emerged Novel Coronavirus (2019-nCoV) In Vitro. Cell Research 30(3): 269-271.

WANG, F., NIE, J., WANG, H. *et al.* (2020c), Characteristics of Peripheral Lymphocyte Subset Alteration in COVID-19 Pneumonia. Journal of Infectious Diseases 221(11): 1762-1769.

WANG, P., NAIR, M.S., LIU, L. *et al.* (2021), Antibody Resistance of SARS-CoV-2 Variants B.1.351 and B.1.1.7. Nature 593(7857): 130-135.

WANG, Q., CHEN, H., SHI, Y. *et al.* (2021), Tracing the Origins of SARS-CoV-2: Lessons Learned from the Past. Cell Research 31: 1139-1141.

WANG, Q., GUO, Y., LIU, L. *et al.* (2023a), Antigenicity and Receptor Affinity of SARS-CoV-2 BA.2.86 Spike. Nature 624(7992): 639-644.

WANG, Q., GUO, Y., ZHANG, R.M. *et al.* (2023b), Antibody Neutralisation of Emerging SARS-CoV-2 Subvariants: EG.5.1 and XBC.1.6. The Lancet Infectious Diseases 23(10): e397-e398.

WANG, Q., IKETANI, S., LI, Z. *et al.* (2023c), Alarming Antibody Evasion Properties of Rising SARS-CoV-2 BQ and XBB Subvariants. Cell 186(2): 279-286.e8.

WANG, Q., GUO, Y., BOWEN, A. *et al.* XBB.1.5 Monovalent mRNA Vaccine Booster Elicits Robust Neutralizing Antibodies against Emerging SARS-CoV-2 Variants. bioRxiv. 2023d; DOI: 10.1101/2023.11.26.568730.

WANG, Y., ZHANG, D., DU, G. *et al.* (2020), Remdesivir in Adults with Severe COVID-19: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicentre Trial. The Lancet 16; 395(10236): 1569-1578.

WEINREICH, D.M., SIVAPALASINGAM, S., NORTON, T. *et al.* (2021), Trial Investigators. REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with COVID-19. New England Journal of Medicine 384(3): 238-251.

WESTENDORF, K., WANG, L., ZENTELIS, S. *et al.* (2022), LY-CoV1404 (Bebtelovimab) Potently Neutralizes SARS-CoV-2 Variants. bioRxiv [Preprint]. 2022 Jan 7:2021.04.30.442182.DOI:10.1101/2021.04.30.442182.

WHO (2019), Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Situation Report-137.

WHO (2023), Statement on the Fifteenth Meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic; https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic

WIBMER, C.K., AYRES, F., HERMANUS, T. *et al.* (2021), SARS-CoV-2 501Y.V2 Escapes Neutralization by South African COVID-19 Donor Plasma. Nature Medicine 27(4): 622-625.

WOLTER, N., JASSAT, W., WALAZA, S. *et al.* (2022), Early Assessment of the Clinical Severity of the SARS-CoV-2 Omicron Variant in South Africa: A Data Linkage Study. The Lancet. 399(10323): 437-446.

WU, F., ZHAO, S., YU, B. *et al.* (2020), A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China. Nature 579 (7798): 265-269.

XU, X., CHEN, P., WANG, J. *et al.* (2020), Evolution of the Novel Coronavirus from the Ongoing Wuhan Outbreak and Modeling of Its Spike Protein for Risk of Human Transmission. Science China Life Sciences 63: 457-460.

ZAROGOULIDIS, P., PAPANAS, N., KIOUMIS, I. *et al.* (2012), Macrolides: From In Vitro Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties to Clinical Practice in Respiratory Diseases. European Journal of Clinical Pharmacology 68(5): 479-503.

ZHANG, C., WU, Z., LI, J.W. *et al.* (2020), Cytokine Release Syndrome in Severe COVID-19: Interleukin-6 Receptor Antagonist Tocilizumab May Be the Key to Reduce Mortality. International Journal of Antimicrobial Agents 55(5): 105954.

ZHANG, R. & MYLONAKIS, E. (2021), In Inpatients with COVID-19, None of Remdesivir, Hydroxychloroquine, Lopinavir, or Interferon β-1a Differed from Standard Care for In-Hospital Mortality. Annales of Internal Medicine 174(2): JC17.

ZHOU, D., DEJNIRATTISAI, W., SUPASA, P. *et al.* (2021), Evidence of Escape of SARS-CoV-2 Variant B.1.351 from Natural and Vaccine-Induced Sera. Cell 184(9): 2348-2361.

ZHU, N., ZHANG, D., WANG, W. *et al.* (2020), A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. New England Journal of Medicine 382(8): 727-733.

ZOU, L., RUAN, F., HUANG, M. *et al.* (2020), SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. New England Journal of Medicine 382(12): 1177-1179.

ZUO, Z., WU, T., PAN, L. *et al.* (2020), Modalities and Mechanisms of Treatment for Coronavirus Disease 2019. Frontiers in Pharmacology 11: 583914.

Capítulo XXIII
Nanotecnologías para el diagnóstico precoz: el caso de la COVID-19

Francisco Gámiz*, Carlos Sampedro, Carlos Márquez, Jorge Ávila, Carlos Navarro, María Isabel Recio, José Carlos Galdón y María Elena Marcos**

Laboratorio de Nanoelectrónica, Grafeno y Materiales Bidimensionales. Centro de Investigación en Tecnologías de la Información y de las Comunicaciones de la Universidad de Granada

Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, ibs-Granada

**Académico correspondiente de la Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-químicas y Naturales de Granada*

***Centro de Salud de Albolote, Sistema Andaluz de Salud, Albolote, Granada*

INTRODUCCIÓN

La COVID-19 es una enfermedad infecciosa causada por el virus SARS-CoV-2 al entrar en contacto con las mucosas respiratorias (orales y nasales) y oculares de los seres humanos. Produce síntomas que incluyen fiebre, tos, disnea (dificultad respiratoria), mialgia (dolor muscular) y fatiga (Gorbalenya *et al.* 2020). En casos graves se caracteriza por producir neumonía bilateral, síndrome de dificultad respiratoria aguda, sepsis y choque circulatorio, y finalmente el fallecimiento del paciente. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infección es mortal entre el 0,5 % y el 1 % de los casos. No existe tratamiento específico plenamente efectivo y las medidas terapéuticas principales consisten en aliviar los síntomas y mantener las funciones vitales. La transmisión del SARS-CoV-2 se produce mediante pequeñas gotas, conocidas como microgotas de Flügge (Lo Giudice 2020), que se emiten al hablar, estornudar, toser o espirar, y que al ser despedidas por un portador (que puede no tener síntomas de la enfermedad o estar incubándola) pasan directamente a otra persona mediante la inhalación; o quedan sobre los objetos y superficies que rodean al emisor, y luego, a través de las manos, que lo recogen del ambiente contaminado, toman contacto con las membranas mucosas orales, nasales y oculares, al tocarse la boca, la nariz o los ojos (Rothan *et al.* 2020). Inicialmente fue llamada «neumonía de Wuhan», puesto que los primeros casos fueron identificados en diciembre de 2019 en la ciudad china de Wuhan al informarse sobre un grupo de personas enfermas con un tipo de neumonía desconocida (Lu *et al.* 2020). La OMS la declaró una emergencia de salud pública de importancia internacional el 30 de enero de 2020 y la reconoció como una pandemia el 11 de marzo de 2020, cuando informó que había 4291 muertos y 118.000 casos en 114 países[1].

A 13 de abril de 2022 la OMS contabiliza más de 500.2 millones de casos confirmados de la enfermedad en 260 países[2] (con una tasa de 950.000 nuevos casos en las últimas 24 horas), y 6.2 millones de fallecidos (4.200 en las últimas 24 horas). La pandemia ha tenido un fuerte efecto socioeconómico a nivel mundial. Durante 2020 y parte de 2021 aproximadamente un tercio de la población mundial fue confinada y se impusieron fuertes restricciones a la libertad de circulación, lo cual condujo a una reducción drástica de la actividad económica (Ceylan *et al.* 2021).

Junto a las vacunas (Kaur *et al.* 2020) (el 60 % de la población mundial se encuentra vacunada con al menos una dosis de alguna de las vacunas disponibles) las pruebas de diagnóstico precoz constituyen la única forma eficiente de rastrear y controlar la propagación del SARS-CoV-2 y acabar con la pandemia. La OMS recomienda pruebas diagnósticas masivas a nivel mundial, lo que implica una necesidad de soluciones tecnológicas que permitan un acceso rápido, fiable y económico al diagnóstico de COVID-19 en respuesta a la pandemia global.

1. https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/

2. Aunque debido al elevado número de casos no comunicados, se estima que el número real de infectados puede superar los 800 millones de personas, lo que supone más del 10 % de la población mundial.

La técnica estándar de referencia para el diagnóstico fiable de COVID-19 ha sido hasta ahora la RT-qPCR (real time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction) (Gibson *et al.* 1996), que requiere un tiempo de procesado de 2 a 4 horas y un entorno de laboratorio clínico con personal altamente especializado. Además de las pruebas genéticas, las pruebas serológicas de flujo lateral, llamadas «pruebas rápidas», se han convertido en herramientas centrales en la lucha contra la pandemia. Éstas se basan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo: los anticuerpos del paciente reconocen las proteínas virales y proporcionan resultados en varios minutos (Peeling *et al.* 2021). Su principal problema es que son cualitativas y solo informan de la presencia de anticuerpos, lo que indica una infección activa o el haber pasado dicha infección. Existe por lo tanto un «gap» en el diagnóstico de la COVID-19 que es necesario cubrir con sistemas que proporcionen una sensibilidad y precisión equiparables a las RT-qPCR y con tiempos de respuesta y sencillez de manejo de los test rápidos, y que permitan conocer el curso de la enfermedad incluso en períodos prepatentes, y todo ello fuera del entorno de un laboratorio clínico, es decir, en aeropuertos, estaciones de tren y autobuses, colegios, universidades, oficinas, residencias de ancianos, etc.

El diagnóstico de una enfermedad en las primeras etapas de su desarrollo es generalmente un factor que condiciona la evolución de la misma y el pronóstico de curación. Para que el diagnóstico precoz sea efectivo los sistemas tienen que ser rápidos, muy baratos y muy simples, y a ser posible, sin necesidad de intervención de personal especializado (laboratorios). Es necesario por tanto un sistema capaz de detectar de manera simple y no invasiva, preferentemente en fluidos (líquidos/gaseosos), señales de nuestro organismo mucho antes de que aparezcan los primeros síntomas clínicos de enfermedad (Sackett 1975). Los signos/señales a detectar son de naturaleza muy diversa: determinados gases, concentración/alteración de proteínas, anticuerpos, reacciones enzimáticas, biomoléculas (DNA, RNA, miRNA, etc.). Los modernos biosensores basados en nanomateriales inteligentes, en particular grafeno y sus derivados (Geim 2009), podrían suponer una solución plausible a corto plazo para el desarrollo de tales sistemas de diagnóstico precoz.

Por otro lado, la determinación del estado presintomático de la enfermedad es de vital importancia para controlar la difusión de la misma, ya que en el caso de la COVID-19 una persona podría estar infectada y propagar el virus previo a su sintomatología. Aunque los biosensores modernos ofrecen una sensibilidad y selectividad notables, el uso de nanomateriales, y en particular, grafeno y sus derivados, reduce significativamente el umbral de detección al tiempo que proporciona la capacidad de determinar simultáneamente múltiples biomarcadores. Para la determinación del estadio de la enfermedad en un paciente COVID (presintomático, sintomático o curado) es necesario disponer de varios sensores sensibles a marcadores diferentes, actuando simultáneamente sobre la misma muestra biológica. Por ello, la solución sería el desarrollo de un chip microfluídico integrado sobre una matriz de sensores de grafeno en cuya superficie se han inmovilizado antígenos recombinantes (aislados y purificados) sensibles a diferentes inmunoglobulinas. Además, el sistema de análisis debería ser portátil, autónomo, de fácil manejo, rápido (segundos desde la toma de la muestra al resultado) y ultrasensible para detectar anticuerpos frente a la proteína S del SARS-CoV-2. Específicamente, el dispositivo a desarrollar detectaría:

1. infección temprana (incluso asintomática) cuantificando anticuerpos en saliva,
2. el curso de la infección en la fase aguda y
3. la superación de la infección y la potencial inmunización del individuo mediante la determinación de anticuerpos en plasma sanguíneo.

El Laboratorio de Nanoelectrónica, Grafeno y Materiales Bidimensionales del Centro de Investigación en Tecnologías de la Información y de las Comunicaciones de la Universidad de Granada participa en varios proyectos de investigación y desarrollo tanto con financiación pública como privada para el desarrollo de una plataforma sensora basada en la multiplexación de dispositivos de grafeno para el diagnóstico precoz de enfermedades[3, 4, 5].

En los siguientes apartados del presente capítulo revisaremos en primer lugar el concepto de biosensor, y cómo los nanomateriales, y en particular el grafeno y los materiales bidimensionales derivados del mismo, contribuyen a mejorar las prestaciones de los biosensores. Revisaremos las propiedades del grafeno y los métodos de obtención, y los principales mecanismos físicos de actuación por los cuales el grafeno ayuda a identificar y cuantificar los analitos presentes en la muestra biológica y que son el objetivo del sensor. Finalmente, tras repasar brevemente algunos resultados de biosensores basados en grafeno presentes en la bibliografía, presentaremos algunos resultados sobre el diagnóstico de COVID-19 obtenidos con el sistema desarrollado en nuestro laboratorio.

3. RAPID-19: Dispositivo diagnóstico «Point of Care» para la detección RAPida de la COVID19. Fondo-Supera COVID-19. CRUE-Banco Santander.
4. DRAINCOV: Sistema de detección rápida de COVID-19» Fondo-Supera COVID-19. CRUE-Banco Santander.
5. UGRVID:CV20-36685: «Sistema electrónico de detección rápida y cuantitativa de inmunoglobulinas para el diagnóstico precoz de COVID-19». Junta de Andalucía.

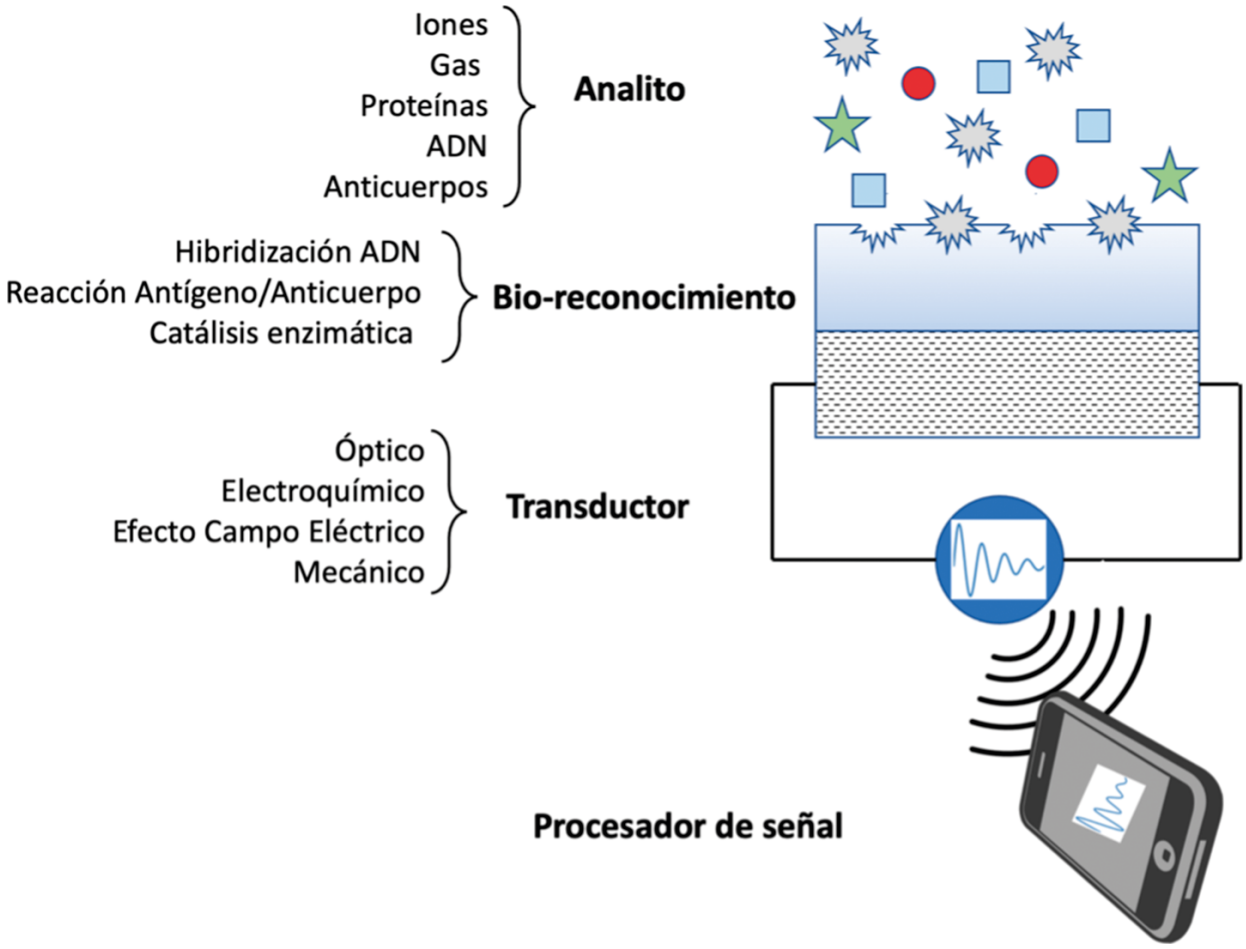


Figura 1. Esquema de funcionamiento de un biosensor

1. BIOSENSORES BASADOS EN NANOMATERIALES

Según la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Turner *et al.* 1987) un biosensor es un dispositivo de medida formado por la integración de tres componentes:

1. Una molécula bioactiva (biorreceptor) capaz de reconocer y reaccionar con la sustancia que se pretende analizar (analito);
2. Un transductor físico-químico íntimamente conectado con la molécula bioactiva y capaz de generar una señal susceptible de ser amplificada cuando se produce la interacción específica con el analito.
3. Un dispositivo electrónico que amplifica y trata la señal y proporciona el resultado de la determinación.

La figura 1 esquematiza el funcionamiento de un biosensor. El receptor bioactivo interacciona específicamente con las moléculas de analito para las que está diseñado. Como consecuencia de esta interacción se produce una señal eléctrica en el transductor. Las características más destacables de estos dispositivos, que los convierten en opciones altamente atractivas como herramientas analíticas, son: su especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta que conduce a un corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, facilidad de automatización, capacidad de trabajar en tiempo real, su versatilidad y bajo coste, entre otras. Por tales motivos, los biosensores han recibido especial atención durante los últimos años. Actualmente el desarrollo de biosensores compromete a diferentes campos de investigación que convergen en tres líneas fundamentales:

1. Elementos de reconocimiento molecular,
2. Herramientas y técnicas para su construcción y
3. Diseño de dispositivos sensores básicos.

Como elementos de reconocimiento se han utilizado numerosos instrumentos biológicos como las enzimas, anticuerpos, cadenas de ácidos nucleicos (ADN, ARN) y proteínas. Las cada vez más consolidadas técnicas de microfabricación, incluida la fabricación a nanoescala, han abierto un panorama de gran porvenir para el desarrollo y aplicación de los biosensores, dada la reducción de

costes que la miniaturización conlleva y la posibilidad de producirlos a gran escala. Si además estos biosensores se integran en una plataforma microelectrónica integrada CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor) su procesamiento posterior es mucho más sencillo, lo que incide en bajos costes, alta fiabilidad y rendimiento en el proceso de integración y fabricación, alta integración, lo que a su vez permite su uso lejos de centros hospitalarios: aplicaciones Laboratory-on-Chip & Point-of-care (Blankenstein *et al.* 1998).

Hasta el día de hoy, el acceso a un estudio de diagnóstico temprano es muy costoso y sigue siendo un lujo al alcance de solo un pequeño sector de la población mundial. La realización de pruebas analíticas fiables de forma rápida a muy bajo costo, es decir, sin involucrar reactivos químicos costosos, equipos médicos sofisticados y personal altamente cualificado, permitiría extender el diagnóstico temprano a la población mundial independientemente de su status económico y social, contribuyendo así a la globalización de la Sanidad, un anhelo perseguido durante siglos. El grafeno (Geim 2009) un material bidimensional señalado como material milagroso por sus propiedades, podría ser el eslabón perdido en la cadena que permitiría hacer realidad este sueño en un corto período de tiempo: resultados recientes muestran que los biosensores basados en materiales bidimensionales podrían hacer que los resultados analíticos estén disponibles al lado de la cama del paciente o en el consultorio del médico en pocos minutos, a bajo costo y con un límite de detección muy bajo (Arvinte *et al.* 2018).

La aplicación realista de este desarrollo solo es posible gracias a la miniaturización de los sensores mediante la aplicación de nanomateriales. La naturaleza de tamaño nanométrico de los nanomateriales y sus propiedades químicas y eléctricas únicas pueden mejorar la atención al paciente al hacer que los sensores sean mínimamente invasivos y extremadamente sensibles (Zhu *et al.* 2010), al tiempo que les brinda una detección de alto rendimiento, bajo límite de detección (LOD), análisis en tiempo real, detección libre de etiquetas y un menor requisito de volumen de muestra para analizar (Chauhan *et al.* 2017). Si bien la selectividad de los sensores es fundamental para detectar su molécula objetivo, la precisión y el límite de detección de los sensores también son parámetros críticos, ya que pueden influir en su valor predictivo positivo y negativo (Peña-Bahamonde *et al.* 2018).

En el caso de los biosensores, recientemente se han propuesto diferentes nanomateriales como transductores (Chauhan *et al.* 2017; Shruthi *et al.* 2014; Nehra *et al.* 2015), incluidos nanomateriales metálicos (Chen *et al.* 2013), nanopartículas de silicio (Slowing *et al.* 2007; Qhobosheane *et al.* 2001), dendrímeros (Satija *et al.* 2011), puntos cuánticos (Geißler *et al.* 2010), nanopartículas poliméricas (Luo *et al.* 2006), nanotubos de carbono (CNTs) (Wang 2005; Yang *et al.* 2015), nanodiamantes (Huanf *et al.* 2004) y nanomateriales 2D (Kaul *et al.* 2014). En particular, en el caso de los nanomateriales 2D, el grafeno, el nitruro de boro hexagonal (h-BN) y los dicalcogenuros de metales de transición (*Transition-Metal Dichalcogenides*, TMDs) (Wang *et al.* 2017) como el disulfuro de molibdeno, MoS_2 (Narayanan *et al.* 2014), el disulfuro de tungsteno, WS_2 (Liu *et al.* 2016) y diseleniuro de niobio, $NbSe_2$ (Choi *et al.* 2017) se han utilizado ampliamente para el desarrollo de biosensores. En el presente apartado centraremos nuestro foco sobre los materiales bidimensionales, como el grafeno y alguno de sus derivados. El grafeno se ha empleado principalmente en el diseño de diferentes biosensores hasta el momento debido a su gran ratio área/superficie, elevada conductividad eléctrica, alta tasa de transferencia de electrones y capacidad para inmovilizar sobre su superficie diferentes moléculas de forma estable.

En la primera parte se revisarán los elementos biológicos sensibles usados en los nanobiosensores. A continuación, se hará una breve revisión de qué son los materiales bidimensionales, cuáles son sus propiedades y cómo se obtienen (Salazar *et al.* 2020). En todos los casos, el biorreceptor (moléculas como anticuerpos, ssDNA, enzimas y proteínas) debe inmovilizarse en la superficie del transductor (fig. 2). Las estrategias de enlace más comunes utilizadas para la inmovilización de bio-macromoléculas en grafeno y sus derivados (óxido de grafeno, óxido de grafeno reducido y TMDs) se pueden dividir principalmente en covalentes y no covalentes (Peña-Bahamonde *et al.* 2018). Se hará un breve repaso de los métodos de inmovilización de bio-partículas sobre superficies de grafeno. Finalmente se revisarán también los diferentes mecanismos físicos puestos en juego en el transductor, esto es, los modos de transducción principales utilizados para convertir la señal biológica en una señal física cuantificable.

1.1. Biorreceptores para biosensores basados en materiales bidimensionales

Un biosensor necesita un elemento biológico sensible que se una específicamente al analito objetivo y produzca una respuesta. En Química y Biología existen varios sistemas formados por dos partículas o moléculas diferentes que interactúan o reaccionan de forma muy selectiva, produciendo una respuesta sensible. Estos incluyen el sistema inmunológico antígeno-anticuerpo, la hibridación de una molécula de ADN monocatenario con su cadena complementaria y la acción catalítica de las enzimas sobre el analito transformándolo de su forma indetectable a una forma detectable.



Figura 2. Mecanismos biológicos para la detección

1.1.1. Biorreceptores basados en el sistema antígeno-anticuerpo

El término antígeno significa «generación de anticuerpos», en referencia a cualquier sustancia que sea capaz de provocar una respuesta inmunitaria (p. ej., la producción de moléculas de anticuerpos específicas) (Wujcik *et al.* 2014). Por definición, un antígeno (Ag) es capaz de combinarse con los anticuerpos específicos (Ab) creados por el sistema inmunitario ante su presencia. Las plataformas analíticas de detección que miden la reacción de conjugación específica entre anticuerpo y antígeno se denominan inmunosensores. La biocompatibilidad y la unión de alta afinidad de los anticuerpos a los antígenos hacen que esta molécula sea atractiva para su uso en diagnósticos. La estructura del anticuerpo (Ab) está formada por cuatro polipéptidos con una característica forma de «Y» (Wujcik *et al.* 2014; Sharma *et al.* 2016). La estructura del Ab consta de dos partes diferenciadas: los brazos y el cuerpo (fig. 3).

Los brazos del Ab contienen dos dominios, un dominio constante y otro variable. Estos dominios variables dictan la función y la selectividad de los anticuerpos frente a antígenos o analitos específicos. Dentro del cuerpo, el fragmento cristalizable (Fc) generalmente interactúa con los receptores o proteínas de la superficie celular, lo que permite que se active el sistema inmunitario, mientras que el fragmento de unión al antígeno (Fab) interactúa con el antígeno. El Fab normalmente tiene una función similar cuando se usa en sensores, mientras que el Fc normalmente se inmoviliza en una superficie o con una etiqueta fluorescente, una nanopartícula magnética, etc. El Fc y el Fab del anticuerpo, que contienen los terminales carboxilo (-COOH) y los terminales amino (-NH2)

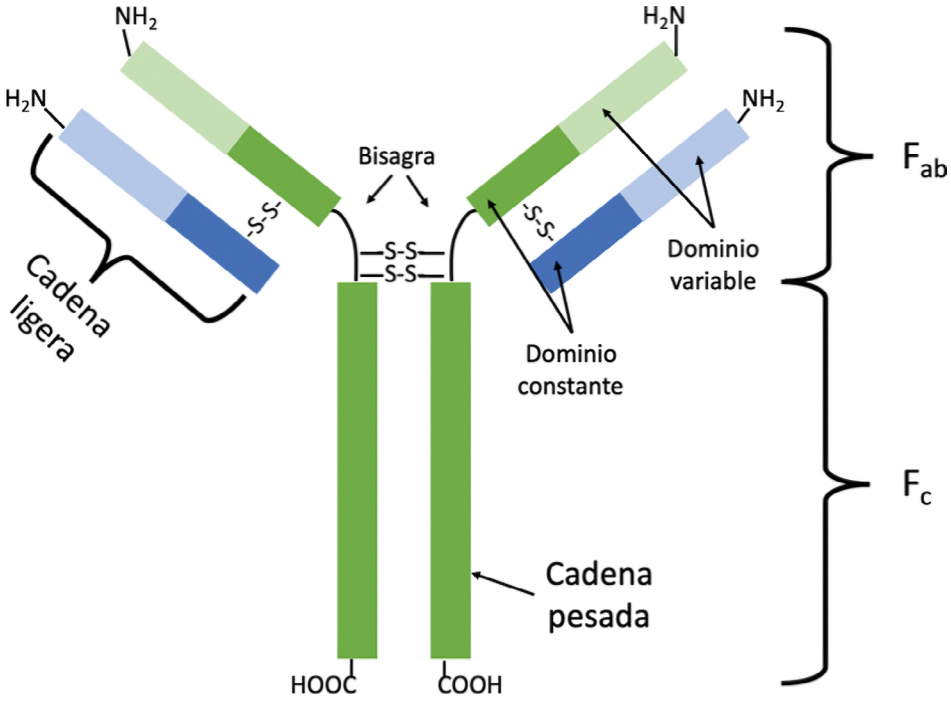


Figura 3. Esquema de la estructura de un anticuerpo (IgG)

del monómero, respectivamente, están unidos por una región bisagra, lo que contribuye a las propiedades biológicas únicas de la molécula y su capacidad para unirse con una alta afinidad (Wujcik *et al.* 2014).

Los nanosensores basados en anticuerpos utilizan los cambios en la molécula producidos por el bioreconocimiento entre el anticuerpo y el antígeno, lo que proporciona un medio atractivo para una técnica de reconocimiento molecular en tiempo real que es altamente sensible y selectiva (Sadik *et al.* 2009).

1.1.2. Biorreceptores basados en ácidos nucleicos

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula compuesta por dos cadenas que se enrollan entre sí para formar una doble hélice que lleva instrucciones genéticas para el desarrollo, funcionamiento, crecimiento y reproducción de todos los organismos conocidos y muchos virus. Junto con las proteínas, los lípidos y los carbohidratos complejos (polisacáridos), los ácidos nucleicos son uno de los cuatro tipos principales de macromoléculas que son esenciales para todas las formas de vida conocidas. Las dos cadenas de ADN también se conocen como polinucleótidos, ya que están compuestas de unidades monoméricas más simples llamadas nucleótidos. Cada nucleótido está compuesto por una de cuatro nucleobases que contienen nitrógeno (citosina [C], guanina [G], adenina [A] o timina [T]), un azúcar llamado desoxirribosa y un grupo fosfato. Los nucleótidos se unen entre sí en una cadena mediante enlaces covalentes entre el azúcar de un nucleótido y el fosfato del siguiente, lo que da como resultado un esqueleto de azúcar-fosfato alterno. Las bases nitrogenadas de las dos cadenas de polinucleótidos separadas se unen, de acuerdo con las reglas de bases complementarias de Chargaff (pares de adenina con timina y pares de citosina con guanina), con enlaces de hidrógeno para formar ADN de doble cadena o ds-DNA. Cuando se calienta el ADN, los enlaces de hidrógeno que mantienen unidos los pares de bases se disuelven y el ADN se separa en dos cadenas sencillas durante un proceso conocido como fusión del ADN, formando así ADN monocatenario o ss-DNA. La temperatura a la que se separan las hebras de ADN se denomina temperatura de fusión. Cuando el ADN se enfría, las bases complementarias se realinean y se unen nuevamente a través de enlaces de hidrógeno. Cuando se juntan hebras simples de ADN de diferentes especies, intentan unirse para formar dobles hélices híbridas. Este proceso se llama hibridación ADN-ADN. Estos segmentos híbridos de ADN se pueden usar para determinar la relación evolutiva de los organismos al examinar qué tan similares o diferentes son las secuencias de pares de bases de ADN. La técnica de hibridación del ADN se basa en dos principios: el primero, que las cadenas dobles de ADN se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarios como ya se mencionó, y el segundo, que cuanto más estrechamente relacionadas estén dos especies, mayor será el número de pares de bases complementarias en el ADN hibridado. En otras palabras, el grado de hibridación es proporcional al grado de similitud entre las moléculas de ADN de las dos especies. La hibridación de cadenas de ADN produce cambios físicos de la molécula (cambios en la carga, absorción óptica, etc.) que son más importantes a medida que aumenta el grado de hibridación.

El ácido desoxirribonucleico tiene una amplia gama de propiedades físicas, químicas y biológicas que hacen que esta biomolécula sea muy adecuada para las tecnologías de biosensores. Entre las propiedades más críticas del ADN para un biosensor se encuentra su flexibilidad, fácil síntesis, fácil química para unirse a diversas plataformas, regeneración simple y alta especificidad debido a secuencias únicas de nucleótidos.

1.1.3. Biorreceptores basados en enzimas catalíticas

Las enzimas merecen especial atención en el diseño de biosensores porque se pueden manipular fácilmente y tienen una gran estabilidad. Las enzimas pueden catalizar un gran número de reacciones con alta especificidad, eficiencia y selectividad. Los biosensores basados en enzimas utilizan principalmente uno de estos dos mecanismos: el primero explota las propiedades catalíticas de las enzimas (la enzima cataliza el analito de su forma indetectable a una forma detectable); el segundo mecanismo se basa en la inhibición/moderación de la actividad enzimática (Gaudin 2017). Cada uno de estos dos mecanismos puede crear un cambio de señal eléctrica detectable en el electrodo sensor que permite la cuantificación de un analito en particular. En particular, esta señal eléctrica se genera a partir del cambio de corriente en la superficie del sustrato como resultado directo de la actividad de la enzima. Las enzimas catalizan reacciones redox, que producen o consumen electrones, alterando así la corriente eléctrica que fluye hacia la plataforma de detección.

1.2. Nanomateriales bidimensionales como transductores

1.2.1. El grafeno y sus propiedades

Las propiedades físicas de los materiales dependen de los átomos que los constituyen y del tipo de enlace químico que se produce entre esos átomos. De hecho, existen en la naturaleza diferentes materiales sólidos cristalinos, con

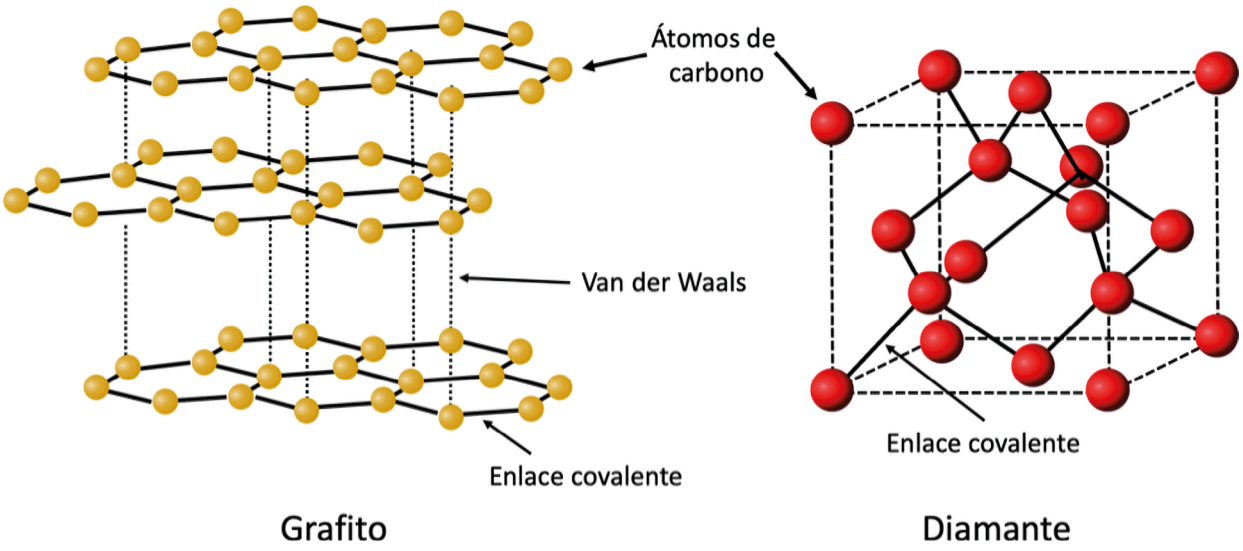


Figura 4. Estructuras cristalinas del diamante y el grafito

exactamente la misma composición química, pero en los que los átomos que los constituyen se unen de forma distinta, lo que les confiere propiedades distintas. Son los denominados alótropos. El carbono, que es el cuarto material en abundancia en el universo y el quinceavo en la corteza terrestre, presenta diferentes formas alótropas siendo el diamante y el grafito las más abundantes. A pesar de ser químicamente la misma sustancia, carbono puro, las propiedades físicas de ambos materiales son completamente diferentes. El diamante que une sus cuatro electrones de valencia mediante fuertes enlaces covalentes con otros cuatro átomos de carbono siguiendo una estructura cubica centrada en las caras y denominada estructura del diamante, es el material más duro de la corteza terrestre (10 en la escala de Mohs) es transparente y aislante eléctrico. Por el contrario, el grafito es un material opaco, muy blando (de 1 a 2 en la escala de Mohs) y buen conductor eléctrico. A diferencia del diamante, en el grafito los átomos de carbono solo utilizan tres de sus electrones de valencia para formar enlaces covalentes con otros átomos de carbono en el mismo plano, disponiéndose estos en una estructura plana hexagonal o de «panel de abeja» en la que cada átomo de carbono ocupa un vértice del hexágono base.

El apilamiento de estos planos mediante fuerzas de van der Waals, mucho más débiles que los enlaces atómicos, da lugar a la estructura del grafito, y a sus propiedades. Las débiles fuerzas de van der Waals hacen que el grafito se exfolie fácilmente, es decir, se descomponga en capas o láminas, bajo una pequeña presión, propiedad que se utiliza desde el siglo XVI para escribir, y que le ha dado el nombre al material (el término grafito deriva del griego γραφειν (grafein) que significa «escribir»). La figura 4 muestra las estructuras cristalinas del diamante y el grafito. Precisamente cada una de estas capas de un solo átomo de espesor se conocen con el nombre de grafeno y aunque se conocía teóricamente desde los años cincuenta (Wallace 1947), durante muchos años se consideró que era imposible obtenerlo de forma aislada pues se creía que como película monoatómica sería termodinámicamente inestable. Sin embargo, en el año 2004, en el laboratorio de los profesores Andre Geim y Konstantin Novoselov en la Universidad de Manchester en el Reino Unido se consiguió aislar experimentalmente por primera vez una lámina monoatómica de grafeno a partir de la exfoliación mecánica de grafito pirolítico altamente orientado (2004) (Novoselov *et al.* 2004). Este descubrimiento les valió a Geim y Novoselov el premio Nobel de Física en 2010 (Dresselhaus *et al.* 2010). En un experimento poco convencional, Geim y Novoselov utilizaron una estructura de grafito tridimensional a la que mediante una cinta adhesiva fueron despegando láminas de grafeno. Recursivamente aplicaron la misma técnica a la parte adherida a la cinta adhesiva hasta quedarse únicamente con una capa de un átomo de espesor que colocaron sobre un substrato de SiO_2/Si. De esta forma no solo demostraron que era posible aislar una capa bidimensional de un solo átomo de espesor, sino que, además, aplicando una tensión al substrato de silicio, demostraron que era posible modular la conductividad de la lámina de grafeno por efecto del campo eléctrico transversal generado.

Precisamente esta estructura hexagonal bidimensional de un solo átomo de espesor, también conocida como «honeycomb» o panel de abeja, le confiere al grafeno unas propiedades físicas espectaculares, tanto estructurales como eléctricas, ópticas y térmicas. El grafeno es un material muy resistente, flexible y transparente

con excelentes propiedades conductoras tanto térmicas cómo eléctricas. Es alrededor de 200 veces más resistente que el acero, más duro que el diamante, tan ligero como las fibras de carbono, pero aún más flexibles que estas, tan denso que ni el helio puede penetrarlo y conduce la electricidad mejor que el cobre. El grafeno es un material muy ligero: una lámina de un metro cuadrado pesa tan solo 0,77 miligramos, y con un gramo podríamos cubrir completamente la superficie de un estadio de fútbol. La movilidad de los portadores de carga en el grafeno es extremadamente alta lo que lo hace un material con una conductividad eléctrica excepcional. Es químicamente estable y sus propiedades eléctricas son muy sensibles a su entorno, que pueden modificarse mediante la aplicación de campos eléctricos o con la colocación de especias cargadas próximas a su superficie. Precisamente gracias a esta última propiedad, el grafeno puede emplearse como canal en dispositivos de efecto campo (Field-Effect transistors, FET) (Novoselov *et al.* 2004). Un transistor de efecto campo es un dispositivo electrónico en el que la conductividad de un trozo de material llamado canal (en este caso grafeno) y que contacta a dos zonas de alta concentración de portadores de carga (drenador [*drain*], y fuente [*source*] generalmente metales como cromo [Cr] y oro [Au]) puede modificarse significativamente dependiendo del valor de un campo eléctrico externo aplicado y que se controla con la tensión aplicada a un terminal denominado puerta y que se acopla capacitivamente al grafeno mediante un aislante (SiO_2) o una solución electrolítica (Millman *et al.* 1967; Reddy *et al.* 2011), como se detallará en el apartado 2.4.3. Este último resultado será clave para la utilización de transistores de efecto campo de grafeno como biosensores (Kedzierski *et al.* 2008).

1.2.2. Técnicas de síntesis de grafeno

A pesar de sus excelentes propiedades, a día de hoy existe la problemática de no haber encontrado un método económico y escalable, que permita obtener muestras de grafeno de tamaño lo suficientemente grande como para poder ser usado a nivel industrial.

Por este motivo, en la actualidad existe un amplio abanico de técnicas para producir grafeno, las cuales suelen agruparse en técnicas «top-down», cuando se obtienen estructuras de espesor nanométrico a partir de un material de mayores dimensiones (métodos de exfoliación o síntesis química), o «bottom-up», en los que se parte de los átomos de carbono, generalmente en forma gaseosa, generados mediante la descomposición de moléculas orgánicas, para formar la estructura del grafeno (métodos de crecimiento epitaxial, deposición química de vapor) (Salazar *et al.* 2021).

a) Exfoliación mecánica

La exfoliación mecánica se refiere al proceso en el que se utiliza la fuerza mecánica para separar las capas de grafeno del grafito. Esto implica bien utilizar una cinta adhesiva para fijar la superficie del grafito y el uso de la fuerza para despegar la cinta junto a las capas de grafeno que se han quedado adheridas a la misma, o frotar la superficie del grafito contra otro material para desprender las láminas de grafeno del volumen. Este método es posible gracias al débil acoplamiento de tipo van der Waals entre las capas de grafeno que constituyen el grafito. La facilidad de producción y el bajo coste en el instrumental requerido hacen que la exfoliación del grafito sea la técnica más generalizada para preparar el grafeno (Green *et al.* 2010). La exfoliación micromecánica con cinta adhesiva es fácil y rápida, y proporciona láminas de grafeno de varias micras de lado, de alta calidad y que son útiles para diversos estudios a nivel de laboratorio (usando esta técnica, Geim y Novoselov consiguieron obtener, de forma fiable y reproducible, películas de grafeno de pocas capas con tamaños de hasta 10 µm y espesores de menos de 10 nm). El principal inconveniente de esta técnica es que no proporciona el suficiente rendimiento de producción para su uso en aplicaciones que no sean exclusivamente científicas. Además, la pureza del material a menudo se ve afectada, ya que pueden aparecer restos de agentes exfoliantes y se pueden introducir varios tipos de defectos, como defectos atómicos, arrugas, u ondulaciones microscópicas, debido a las tensiones inducidas en la capa de grafeno durante la deposición sobre el sustrato final.

b) Crecimiento epitaxial

La epitaxia utiliza la estructura atómica de un sustrato cristalino para sustentar el crecimiento de un material depositado sobre este. En el caso del crecimiento epitaxial de grafeno se utiliza carburo de silicio (SiC) como substrato. Tras un proceso de calentamiento a temperaturas muy elevadas, alrededor de los 1200 °C, y en condiciones de ultra alto vacío (UHV), se produce la sublimación de los átomos de silicio de las capas superiores, dejando atrás los átomos de carbono del SiC que se reordenan para formar algunas capas de grafeno sobre la superficie (Berger *et al.* 2006). El número de capas puede controlarse limitando el tiempo o la temperatura en la etapa de calentamiento. La calidad y el número de capas en las muestras también dependen de la cara de SiC utilizada para su crecimiento: la superficie terminada en carbono produce pocas capas, pero estas tienen una baja conductividad, mientras que la superficie terminada en silicio produce varias capas de grafeno, pero con conductividad alta. Los valores de conductividad medidos en el grafeno epitaxial son inferiores a los medidos en el grafeno

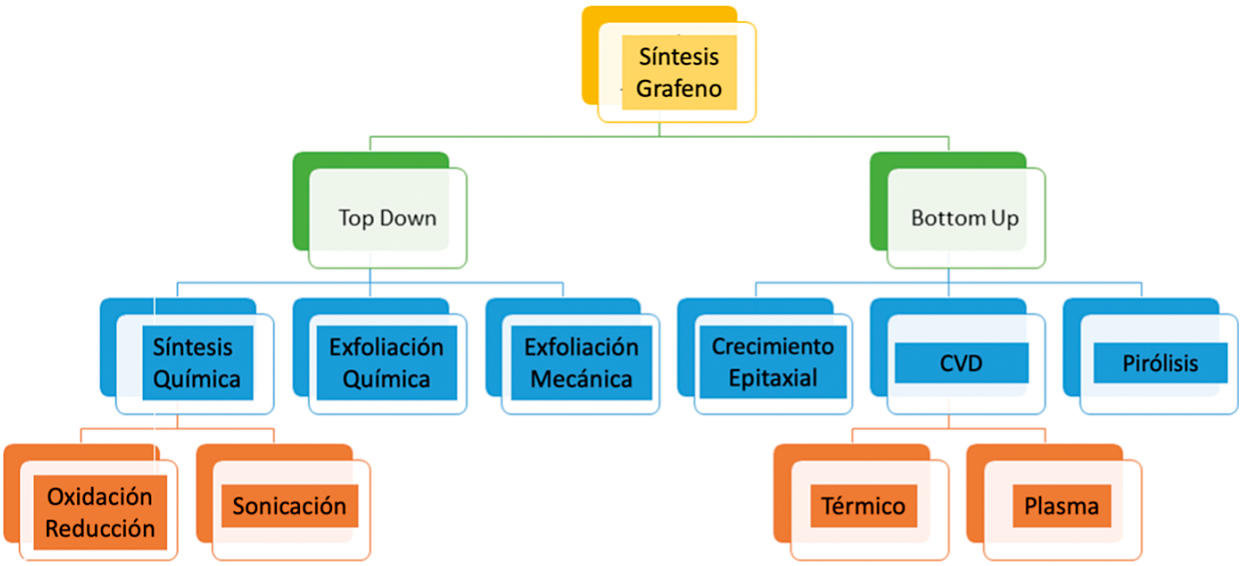


Figura 5. Métodos de obtención de grafeno

exfoliado (Gu *et al.* 2007). Se ha comprobado que las películas de grafeno preparadas en UHV exhiben una morfología rugosa y muestran áreas de diferentes grosores, que potencialmente podrían ser responsables de la disminución de la movilidad registrada para estas películas.

c) Deposición química en fase de vapor (CVD)

Una de las técnicas más populares para la síntesis a gran escala de películas de grafeno es la deposición química de vapor (CVD) sobre superficies de metal, debido a su bajo coste, reproductibilidad y razonablemente alta calidad de producción (Gao *et al.* 2014). A diferencia de las láminas disgregadas aleatoriamente que se obtienen en los métodos de exfoliación, el crecimiento por CVD produce grandes superficies de grafeno continuas y uniformes, aunque no necesariamente monocristalina.

Aunque históricamente, la formación de las capas de grafito a partir del procesado de metales de transición y la exposición a fuentes de carbono en forma de hidrocarburos o de carbono evaporado, se conoce desde hace más de 50 años (Mattevi *et al.* 2011), el actual interés sobre este material ha llevado a una renovada tendencia por obtener láminas de grafeno con un número de capas controlado, sobre varios tipos de sustratos de metal (Ni, Co, Ru, Ir, Re, Pt, Pa y Cu entre otros) mediante esta técnica de deposición. Para el crecimiento CVD se introduce una delgada lámina policristalina de un metal (principalmente Cu o Ni) en un horno de cuarzo y se calienta a una temperatura en el rango de 950 a 1050 °C generalmente a baja presión y en un ambiente rico en hidrógeno y argón para producir la reducción de la superficie del metal y eliminar el posible óxido que pudiese encontrarse en la misma. Una vez alcanzada la temperatura y realizado el «annealing» o recocido se introduce la fuente gaseosa de carbono, habitualmente metano, CH_4 o acetileno C_2H_2.

El crecimiento del grafeno es consecuencia de la descomposición catalítica y la posterior segregación o adsorción de átomos de carbono, durante las etapas de calentamiento y enfriamiento del substrato metaestable catalizador como es el caso del substrato de cobre empleado. El potencial catalítico de los metales de transición surge de que estos proporcionan fases de baja energía para llevar a cabo las reacciones, cambiando los estados de oxidación fácilmente o mediante la formación de compuestos intermedios que pueden absorber y activar el medio de reacción. Una vez que el carbono se ha descompuesto, este puede ser adsorbido por el metal y luego precipitar para formar grafeno en su superficie.

Una vez obtenido el grafeno sobre el substrato metálico, el paso siguiente es la separación del grafeno del substrato, operación que puede realizarse mediante diferentes métodos desde el ataque químico y disolución del metal, hasta el «peeling» electroquímico o mecánico (Ma *et al.* 2019).

Después de la separación del grafeno del sustrato metálico, este se transfiere a otros sustratos, proporcionando capas de grafeno de alta calidad sin tratamientos mecánicos o químicos complicados, y sobre el que puede fabricar dispositivos electrónicos utilizando técnicas de fabricación de la industria microelectrónica.

d) Reducción de óxido de grafeno

El término «óxido de grafeno», es el nombre que se da al grafeno que ha sido tratado por un fuerte oxidante para alterar la naturaleza cristalina de su red atómica incorporando grupos funcionales epóxido e hidroxilo. En la

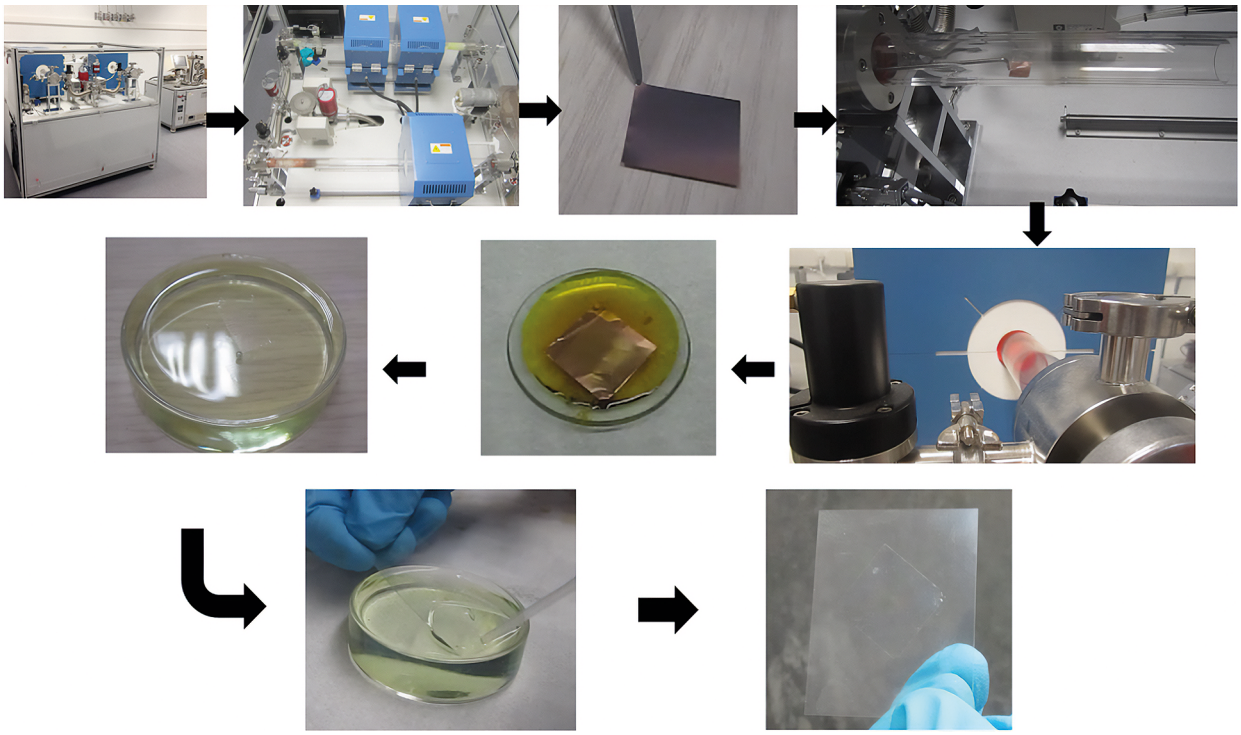


Figura 6. Esquema de crecimiento de grafeno por el método CVD. 1 y 2) Horno CVD en el laboratorio de Nanoelectrónica de la UGR; 3) Sustrato de cobre; 4) Introducción del sustrato de cobre en el tubo de cuarzo; 5) Reducción de la superficie del cobre y crecimiento de grafeno; 6) Eliminación del substrato de cobre mediante ataque químico con cloruro férrico; 7) Enjuague de la lámina de grafeno en agua desionizada; 8) Transferencia sobre substrato PET (tereftalato de polietileno); 9) Resultado final

actualidad, la síntesis química del óxido de grafeno a partir del grafito ha surgido como una ruta viable para producir láminas de grafeno a gran escala (Gomez-Navarro *et al.* 2007). Por lo general, el óxido de grafito se sintetiza a través de la oxidación del grafito, basándose en el método de Hummers (Hummers *et al.* 1958), en el que se utilizan oxidantes como el ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), el ácido nítrico concentrado (HNO_3) y el permanganato potásico ($KMnO_4$). La reacción solo tarda 2 horas en completarse y la temperatura no sobrepasa los 45 °C, minimizando la posibilidad de explosión durante el proceso. Comparado con el grafito prístino, el óxido de grafeno está fuertemente oxigenado, portando grupos funcionales hidroxilo (-OH) y epóxido (C-O-C) en el plano basal de los átomos de carbono de hibridación sp^3, además de los grupos carboxilo (COOH) situados en los bordes de la lámina de hibridación sp^2 del carbono. Estos grupos funcionales proporcionan una amplia variedad de reacciones de modificación de superficie para desarrollar materiales basados en óxido de grafeno funcionalizado, lo que abre nuevas vías para la combinación del grafeno con otros materiales y superficies para mejorar su aplicabilidad. Sin embargo, debido a la alteración de la estructura electrónica provocada por estos grupos funcionales, el óxido de grafeno contiene defectos y desórdenes irreversibles que degradan sus propiedades eléctricas haciéndolo eléctricamente aislante, aunque su posterior reducción, puede restaurar parcialmente la conductividad, pero a valores siempre por debajo de los del grafeno prístino (Stankovich *et al.* 2007). Esto hace que este método sea menos atractivo, en comparación con la exfoliación mecánica, para aplicaciones que sean muy estrictas en cuanto a los requisitos de calidad del cristal. Una vez que el grafito ha sido oxidado, este puede exfoliarse ya sea por sonicación o por una agitación prolongada en agua, produciendo una dispersión homogénea e indefinidamente estable que consiste principalmente en láminas de una sola capa (óxido de grafeno). La naturaleza hidrófila del óxido de grafeno implica que las moléculas de agua se pueden intercalar fácilmente en el óxido de grafito, provocando la separación interlaminar. Además, las cargas superficiales en el óxido de grafeno son altamente negativas cuando se dispersa en agua, debido a la ionización del ácido carboxílico y los grupos hidroxilo fenólicos (Li *et al.* 2008), provocando una repulsión electrostática que evita que los coloides de óxido de grafeno se re-agreguen. Finalmente, el óxido de grafeno puede ser depositado como una película fina sobre casi cualquier superficie, y convertirse a grafeno (u óxido de grafeno reducido) por métodos químicos que suponen el uso de agentes reductores como la hidracina (N_2H_4) (Stankovich *et al.* 2007) o el borohidruro

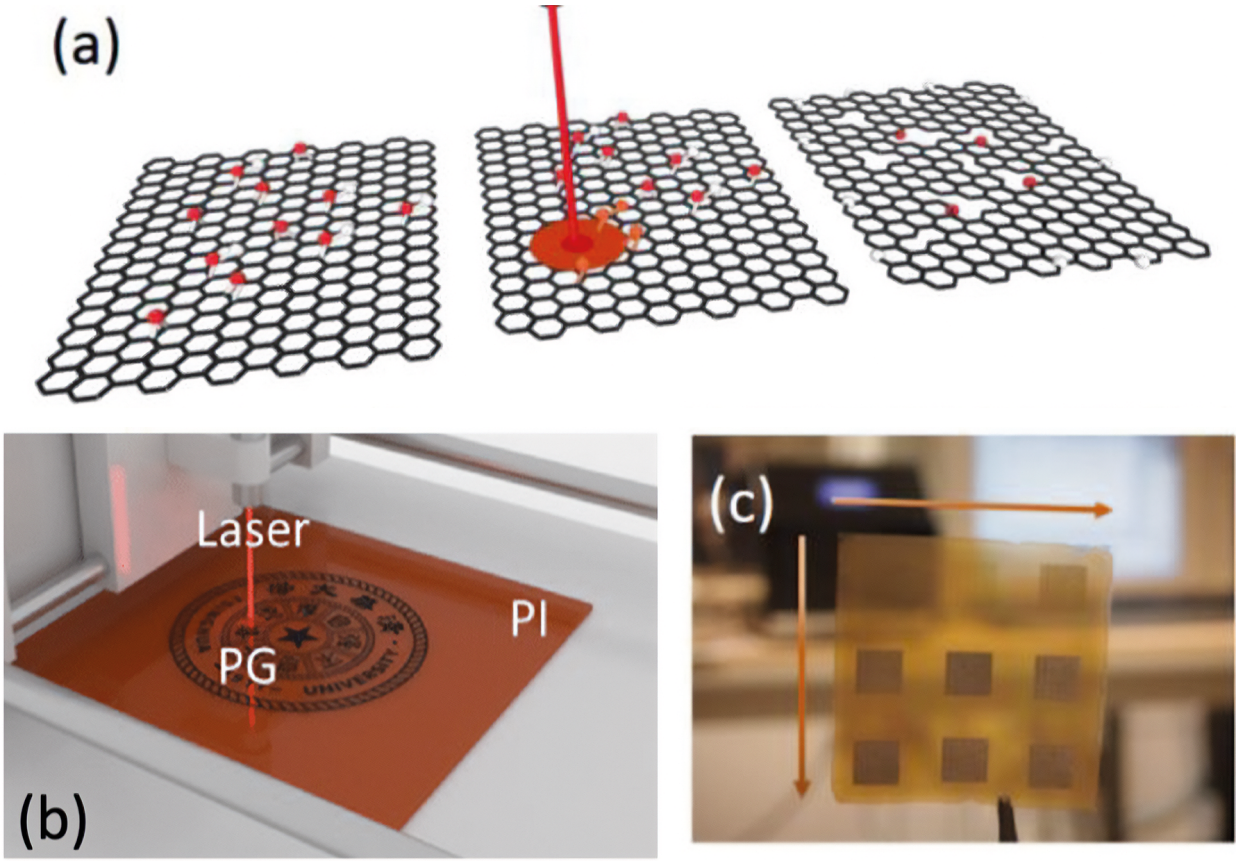


Figura 7 (a) Esquema del proceso de reducción laser; de izquierda a derecha: lámina de óxido de grafeno presentando grupos funcionales; proceso de reducción fototérmico láser; óxido de grafeno reducido una vez eliminados los grupos funcionales. (b) Detalle de unas de las unidades de control numérico (CNC) con una cabeza láser. (c) Detalle de una muestra de óxido de grafeno con motivos cuadrados de 1 cm^2 de óxido de grafeno reducido obtenidos a potencias láser crecientes

de sodio ($NaBH_4$) (Bourlinos *et al.* 2003), ácido L-ascórbico (Zhang *et al.* 2010), o por tratamientos térmicos o fototérmicos mediante láser (Marquez *et al.* 2016). Este último método presenta cuatro ventajas fundamentales frente a los procedimientos de reducción química:

1. Permite controlar la eficiencia de reducción a través de la potencia fototérmica aplicada con el láser. Las variables de control son la potencia del láser, la longitud de onda del láser y la velocidad de excursión del haz sobre la superficie de la muestra.
2. El láser controlado por una unidad de control numérico (CNC) permite realizar patrones litográficos directamente, sin necesidad de un proceso litográfico posterior o el uso de máscaras. La resolución viene determinada por el sistema de posicionamiento del láser.
3. Es un procedimiento económico (solo es necesario invertir inicialmente en la adquisición de los equipos láser).
4. Es un procedimiento ecológico (frente a otras aproximaciones que requieren del uso de reactivos que provocan reacciones altamente exotérmicas como la hidrazina).

En la figura 7B se muestra una fotografía de un equipo de reducción láser de baja potencia. La figura 7C presenta un ejemplo de muestra de óxido de grafeno, con motivos litográficos en forma de cuadrado de 1 cm × 1 cm de óxido de grafeno reducido a potencias de láser crecientes. A medida que la potencia del láser aumenta, el óxido de grafeno va perdiendo su transparencia tornándose oscuro, consecuencia de la recuperación de las estructuras grafíticas. El procedimiento de reducción láser permite modular la conductividad de la muestra directamente a través de la potencia fototérmica de forma muy precisa. La modulación de la conductividad permitirá crear zonas aislantes que constituyan la pasivación de los circuitos (óxido de grafeno sin reducir), y zonas conductoras que pueden formar las líneas de conducción o los electrodos (óxido de grafeno completamente reducido). Todo ello bajo un mismo proceso litográfico cuya resolución viene determinada por el sistema de control numérico del láser. Este procedimiento ya se ha mostrado efectivo para la fabricación de circuitos eléctricos pasivos básicos como estructuras de condensadores y filtros (fig. 7C), antenas flexibles, y *displays* electroforéticos.

Al realizarse el proceso de reducción y la fotolitografía en el sustrato final que soporta el circuito, no son necesarios los procesos de transferencia que pueden degradar las características eléctricas. Además, el sustrato final puede ser flexible como el ejemplo de la figura 7C en el que se ha empleado un sustrato de tereftalato de polietileno (PET).

1.3. Inmovilización de biomoléculas sobre la superficie del grafeno

Para que la superficie del sensor pueda realizar la transducción del evento de reconocimiento biológico en una señal eléctrica es necesario fijar o inmovilizar los biorreceptores sobre la superficie del grafeno mediante el proceso conocido con el nombre de funcionalización (Georgakilas *et al.* 2012; Alhazmi *et al.* 2022). La funcionalización implica el proceso de agregar nuevas funciones, características, o propiedades al grafeno cambiando la química de su superficie (Zhao *et al.* 2017; Saini 2016). La modificación de la superficie del grafeno prístino puede realizarse principalmente a través de dos estrategias: funcionalización covalente y funcionalización no covalente (Filice *et al.* 2021). Ambas estrategias proporcionan una multitud de superficies de grafeno activadas químicamente (Craciun *et al.* 2013). La funcionalización covalente forma un enlace covalente estable entre el grafeno y la molécula modificadora, mientras que la funcionalización no covalente se forma a través de enlaces de hidrógeno, interacciones π-π e interacciones de van der Waals (Vacchi *et al.* 2017) con la molécula modificadora.

La funcionalización covalente del grafeno implica la rehibridación de átomos de carbono sp^2 a la configuración tetraédrica con hibridación sp^3 (Park 2013). Este proceso de modificaciones superficiales covalentes también se conoce como quimisorción de moléculas en la red de grafeno (Daukiya *et al.* 2019). La adición de radicales libres se encuentran entre las reacciones más comunes para la modificación covalente de la superficie del grafeno. Los radicales libres son especies químicas sin carga extremadamente reactivas que contienen un electrón desapareado. Pueden reaccionar fácilmente con los compuestos que contienen enlaces múltiples para producir otro radical, que sigue reaccionando (Liu *et al.* 2019) y que sirve de enlace para anclar las biomoléculas a la superficie del sensor. Los radicales libres se pueden lograr a través de uno o más enfoques sintéticos, como el uso de sales de aril diazonio (Yu *et al.* 2014), peróxidos, ciclación de Bergman (Ma *et al.* 2012) y la reacción de Kolbe-Schmitt (Eng *et al.* 2017). La modificación covalente es muy agresiva y puede acabar modificando y degradando las propiedades eléctricas del grafeno pristino.

En cambio, la funcionalización no-covalente, en general, es mucho más benévola que la funcionalización covalente con las propiedades eléctricas de la lámina de grafeno. Las interacciones no covalentes son interacciones reversibles entre el grafeno y las moléculas orgánicas o polímeros sin perturbar el sistema π deslocalizado del grafeno y, por lo tanto, sus propiedades electrónicas (Tasis *et al.* 2006). Las fuerzas físicas como las fuerzas hidrofóbicas, de van der Waals y electrostáticas son las principales formas de interacción utilizadas en la funcionalización no covalente (Umadevi *et al.* 2014). Se han publicado numerosos estudios sobre la inmovilización de proteínas, complejos de ADN-proteína, complejos enzimáticos, nanomateriales funcionales y supramoléculas orgánicas utilizando una técnica de funcionalización no covalente (Zhou *et al.* 2019). En los últimos años, se lograron enormes avances en términos de funcionalización del grafeno a través del apilamiento π-π con compuestos poliaromáticos como naftaleno o pireno (Kim *et al.* 2002), entre otros.

1.4. Mecanismos sensores

Una vez que el elemento biológico sensible ha producido una respuesta (es decir, la señal biológica), el sistema debe convertirla en una señal física utilizable con alta sensibilidad y mínima perturbación (Perumal *et al.* 2014). Las señales detectables pueden ser electroquímicas (potenciometría, conductimetría, amperometría, voltamperometría, etc.), ópticas (colorimétricas, fluorescentes, luminiscentes, interferométricas), calorimétricas (termistor), de cambio de masa (onda piezoeléctrica/acústica) o de naturaleza magnética. Por lo tanto, los biosensores se pueden clasificar en función de la gran variedad de métodos de transducción que emplean. En el caso de los sensores basados en materiales 2D, la mayoría de las formas se pueden clasificar en una de las tres clases siguientes (Karunakaran *et al.* 2015):

1. Métodos de detección óptica.
2. Métodos de detección electroquímica.
3. Basados en transistores de efecto campo.

1.4.1. Nanobiosensores basados en métodos de detección óptica

Los materiales bidimensionales han llamado la atención de muchos investigadores en el campo de la detección óptica debido a sus propiedades. Por ejemplo, en (Zhu *et al.* 2015) puede encontrarse una excelente revisión del uso de grafeno y los materiales 2D para la detección óptica. Las propiedades ópticas de la superficie del sensor pueden verse alteradas cuando el analito y el biorreceptor se unen a él. Los cambios pueden producirse en

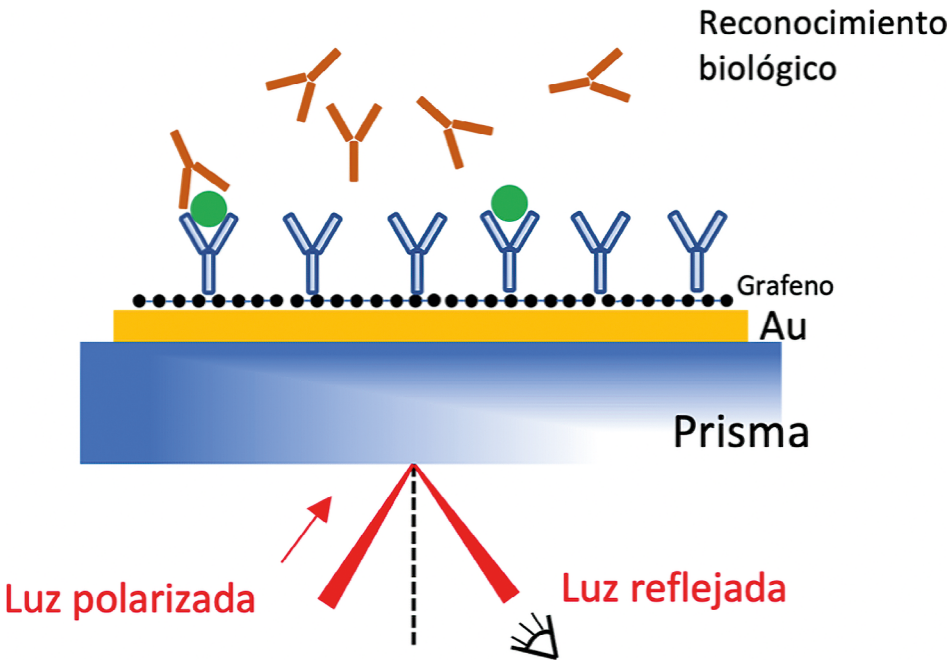


Figura 8. Esquema de un biosensor de resonancia de plasmones superficiales SPR con una lámina de grafeno depositada sobre la película metálica

la absorbancia, fotoluminiscencia, quimioluminiscencia, fluorescencia, dispersión de la luz, reflectancia o cambios en el índice de refracción de la superficie. Muchos sensores ópticos se han desarrollado a través de la teoría básica de las técnicas de detección colorimétricas, plasmónicas y de fluorescencia: encendido (mejora), apagado (apagado) y transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Yoo *et al.* 2016).

Por ejemplo, los biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR) son sensores ópticos que utilizan ondas de polaritón de plasmón superficial para caracterizar las interacciones entre las biomoléculas y la superficie del sensor (Wu *et al.* 2010). Un polaritón de plasmón superficial (SPP) es una onda electromagnética evanescente confinada perpendicularmente, que se propaga en la interfaz entre un metal y un dieléctrico (Maier 2007). En el medio de detección, un cambio en la concentración de biomoléculas producirá un cambio local en el índice de refracción (RI) cerca de la superficie del metal. El cambio del índice de refracción, a su vez, conducirá a un cambio en la constante de propagación del polaritón (SPP), que puede medirse ópticamente mediante el método de reflexión total atenuada (ATR) (Raether 1988). En la fabricación de un biosensor SPR convencional, se recubre con una película metálica delgada un lado de un prisma óptico, separando así el medio de detección y el prisma. La película metálica está hecha generalmente de metales nobles, como el oro y la plata, que soportan la propagación del polaritón de plasmón superficial en frecuencias de la luz visible. Por lo general, se prefiere el oro porque tiene buena resistencia a la oxidación y la corrosión en diferentes entornos. Sin embargo, las biomoléculas se adsorben mal en el oro. Este inconveniente limita la sensibilidad del biosensor SPR convencional. Un método atractivo para mejorar la sensibilidad del biosensor SPR es utilizar una lámina de grafeno que recubra la superficie de oro en la configuración convencional del biosensor SPR (Wu *et al.* 2010). Según (Szunerits *et al.* 2013) las superficies SPR funcionalizadas con grafeno tienen varias ventajas:

1. El grafeno tiene una relación superficie-volumen muy alta que se espera que sea beneficiosa para la adsorción eficiente de biomoléculas en comparación con el oro.
2. El grafeno aumenta la adsorción de moléculas orgánicas y biológicas porque la estructura de anillo basada en carbono de estas moléculas permite la interacción de apilamiento π con las células hexagonales del grafeno (Song *et al.* 2010).
3. La presencia de grafeno en la parte superior de la plata pasiva la superficie contra la oxidación, lo que hace posible el uso de la plata como interfaz plasmón-activa.
4. Controlar la cantidad de capas de grafeno transferidas a la interfaz de metal permite controlar la respuesta de SPR y la sensibilidad de las mediciones de SPR.

Todo esto en conjunto de ventajas da como resultado un rendimiento y una sensibilidad mejorados de los sensores basados en SPR (Wu *et al.* 2010) cuando se deposita una capa de grafeno sobre el metal.

Otro gran grupo de sensores ópticos se basan en el fenómeno de la luminiscencia. La luminiscencia es la emisión de luz por ciertos materiales como consecuencia de que sus átomos o moléculas se relajan desde un

estado excitado a su estado fundamental. Según el origen de la fuente de energía utilizada para obtener el estado excitado aparecen diferentes tipos de luminiscencia: fotoluminiscencia (también llamada fluorescencia o fosforescencia) cuando la energía de excitación es suministrada por una onda electromagnética; quimioluminiscencia si la energía procede de una reacción química; piroluminiscencia si la fuente de energía es el calor; catodoluminiscencia si la energía que excita los átomos o moléculas procede de un impacto con electrones. La fluorescencia requiere una fuente de luz externa para iniciar las transiciones electrónicas en el átomo o molécula que luego produce la emisión de luz (generalmente de una longitud de onda más larga que la de la fuente de excitación), es decir, luminiscencia. Los compuestos químicos o moléculas que poseen esta propiedad se conocen como fluoróforos o fluorocromos. Dado que la mayoría de los elementos de detección biológicos y la mayoría de los analitos no son fluoróforos, en un sensor basado en fluorescencia, las sondas fluorescentes específicas se vinculan química, enzimática o genéticamente al elemento de reconocimiento (biorreceptor) que identifica y captura el analito, transduciendo así el evento de bio-reconocimiento a una señal óptica (Perumal *et al.* 2014). Por ejemplo, se utilizan ácidos nucleicos o anticuerpos para etiquetar con fluorocromos y convertir la interacción de hibridación entre dos cadenas de ADN complementarias en una señal óptica (Schultz *et al.* 2008). En general, puede ocurrir cualquier cambio en la señal fluorescente, ya sea debido a la extinción de la fluorescencia (apagado) (Chen *et al.* 1999) o al aumento de la fluorescencia (encendido) (Li *et al.* 2013) o a la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Liu *et al.* 2010).

La estructura de bandas del grafeno prístino no presenta banda prohibida y, por lo tanto, su uso en aplicaciones basadas en luminiscencia fotoexcitada es limitado. Alternativamente, se pueden usar algunos derivados del grafeno, como el óxido de grafeno (GO), el óxido de grafeno reducido (rGO), los puntos cuánticos de grafeno (GQD) y los nanocompuestos. Tanto GO como GQD se han utilizado ampliamente como plataformas de biodetección óptica en el pasado debido a su capacidad para acoplarse fácilmente a varias biomoléculas, su capacidad para la fluorescencia, fácil dispersabilidad en agua, versátil modificación de superficie, banda prohibida sintonizable y buena resistencia al fotoblanqueo, o «*photobleaching*», es decir a la pérdida de sus propiedades fotoquímicas (Zhu *et al.* 2015). El óxido de grafeno presenta capacidades tanto de extinción de fluorescencia como de fluorescencia sintonizable, y el predominio de uno sobre el otro depende del método de oxidación y del tamaño y forma de los copos (Zgu *et al.* 2015). Se pueden encontrar muchos ejemplos en la literatura sobre el uso de GO y GQD para la detección óptica (Zhang *et al.* 2017).

1.4.2. Nanobiosensores basados en métodos electroquímicos

Un biosensor electroquímico es un dispositivo integrado autónomo que es capaz de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa específica utilizando un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) que se mantiene en contacto con un elemento de transducción electroquímica (Thevenot *et al.* 1999). Los biosensores electroquímicos miden la corriente producida por las reacciones de oxidación y reducción en un electrodo que se utiliza como elemento de transducción. La corriente producida se puede correlacionar con la concentración de las especies electroactivas presentes o con su tasa de producción/consumo. La señal eléctrica resultante está relacionada con el proceso de reconocimiento por parte de la diana y el analito y es proporcional a la concentración del analito.

Dentro de los transductores electroquímicos se pueden diferenciar tres subclases, en función de la propiedad eléctrica que sea medida: los sensores conductimétricos, que miden la conductividad del medio; los transductores potenciométricos, que miden una diferencia de potencial entre dos electrodos; los transductores amperométricos, que registran la intensidad de corriente (Perumal *et al.* 2014)

Los transductores **conductimétricos** miden un cambio en la conductividad eléctrica de un medio determinado, utilizando dos electrodos que están separados una cierta distancia (Taylor *et al.* 1996). La conductividad de una disolución depende de la variación de la movilidad de los iones presentes en el medio de medida. Cada especie iónica tiene una movilidad determinada, por tanto, si las especies del medio cambian como consecuencia de una reacción química o bioquímica, la conductividad del medio se verá afectada. Los transductores conductimétricos miden esa variación de especies iónicas, como consecuencia de la reacción biológica de interés. Los transductores conductimétricos se han utilizado principalmente para el desarrollo de biosensores enzimáticos, ya que las reacciones enzimáticas producen cambios en la fuerza iónica del medio. Por ejemplo, inmovilizando nitrato reductasa sobre la superficie de un electrodo de oro es posible determinar la presencia de nitratos en muestras de agua (Saha *et al.* 2012).

Los transductores potenciométricos se basan en la medida de la diferencia de potencial entre un electrodo de referencia y un electrodo de trabajo. Los transductores potenciométricos más utilizados son los electrodos selectivos de iones como el electrodo de pH. En los

biosensores potenciométricos, la concentración de analito se relaciona con el potencial medido gracias a la ecuación de Nernst, en la que el logaritmo de la concentración de la sustancia que se mide es proporcional a la diferencia de potencial (Vidal-Iglesias *et al.* 2012). Normalmente, el elemento transductor de los biosensores potenciométricos está formado por un electrodo selectivo de iones como electrodo de trabajo. Los electrodos más usados con esta finalidad son el electrodo de pH, electrodos selectivos a iones como el Na^+, el K^+ o el NH_4^+, y electrodos de gases como el de CO_2. Sobre el electrodo de trabajo se inmoviliza el biorreceptor y se mide la diferencia de potencial contra el electrodo de referencia, que en la mayoría de los casos está integrado al de trabajo. Un ejemplo de biosensor potenciométrico es el biosensor para determinar urea (Chu *et al.* 2016). En este biosensor, se inmoviliza ureasa sobre la superficie del electrodo de trabajo. La enzima cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y se mide la concentración de iones amonio formados gracias a la presencia de un electrodo selectivo de iones NH_4^+.

Los sensores **amperométricos** se basan en la medida de la corriente resultante de la oxidación y reducción de una especie electroactiva en una reacción bioquímica que depende principalmente de la concentración de un analito con un potencial fijo (fig. 12). Hay tres tipos de electrodos que generalmente se emplean en un sensor amperométrico: el electrodo de trabajo que suele estar hecho de oro (Au), carbono (C) o platino (Pt); un electrodo de referencia generalmente plata o cloruro de plata (Ag/AgCl) que tiene un potencial fijo y que controla el potencial del electrodo de trabajo y el tercer electrodo que se llama contador o auxiliar que se incluye a veces para ayudar a medir el flujo de corriente (Taylor *et al.* 1996). A medida que ciertas moléculas se oxidan o reducen (reacciones redox) en electrodos metálicos inertes, los electrones se transfieren del analito al electrodo de trabajo o al analito desde el electrodo (Banica 2012). La dirección del flujo de electrones depende de las propiedades del analito que pueden controlarse mediante el potencial eléctrico aplicado al electrodo de trabajo. Si el electrodo de trabajo se conduce a un potencial positivo, se produce una reacción de oxidación y el flujo de corriente depende de la concentración de la especie electroactiva (analito) que se difunde a la superficie del electrodo de trabajo. De manera similar, si el electrodo de trabajo se conduce a un potencial negativo, se produce una reacción de reducción. A menudo se usa un tercer electrodo llamado contraelectrodo para ayudar a medir el flujo de corriente.

El grafeno posee propiedades físicas y electroquímicas sobresalientes, como una gran área superficial, alta conductividad, abundante actividad electrocatalítica y una tasa rápida de transferencia de electrones (Chauhan

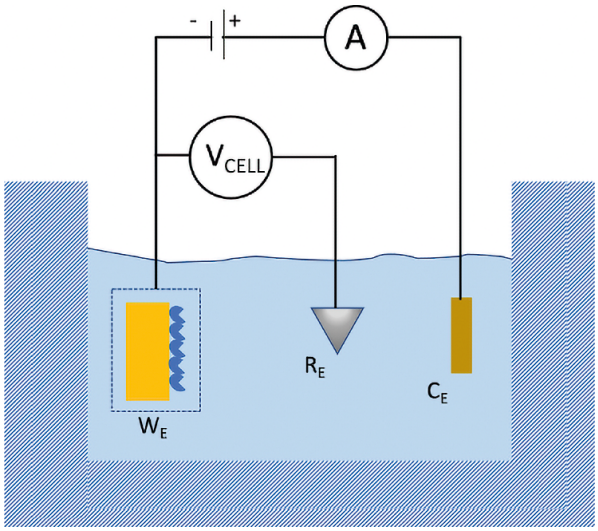


Figura 9. Esquema de un biosensor amperométrico

et al. 2017; Shao *et al.* 2010; McCreery 2008), por lo que se han desarrollado varios sensores electroquímicos basados en grafeno y compuestos de grafeno para bioanálisis y análisis ambiental (Shao *et al.* 2010; Wu *et al.* 2013). Para una revisión más amplia de la electroquímica del grafeno y materiales relacionados, consulte el trabajo de (Ambrosi *et al.* 2014). Uno de los ejemplos más estudiados es el sensor de glucosa basado en grafeno. Para detectar glucosa, el electrodo basado en grafeno generalmente es modificado con glucosa oxidasa (GOD). El biosensor desarrollado por (Zeng *et al.* 2011) con electrodos modificados con óxido de grafeno reducido químicamente (rGO), chitosán (quitosano) y nanopartículas (NP) de Pd muestra un límite de detección de glucosa tan bajo como 0.2 µM. El rendimiento superior se puede atribuir a la funcionalización covalente de rGO con chitosán, que mejora la hidrofilia y la biocompatibilidad del rGO; y la carga alta y bien dispersa de NP de Pd con tamaño pequeño (~4-5 nm) y su alta actividad electrocatalítica (Wu *et al.* 2013). En un trabajo reciente, Shen *et al.* (2017) prepararon un compuesto bimetálico de AuPd sobre una película de óxido de grafeno reducido/poliimida (PI/RGO) mediante electrodeposición. El AuPd fabricado sobre la película PI/RGO exhibe buena conductividad y excelentes propiedades catalíticas. El electrodo AuPd/PI/RGO muestra una alta actividad electroquímica hacia el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por el efecto de acoplamiento entre la película AuPd y PI/rGO. Los autores también desarrollaron un biosensor de glucosa amperométrico, que se logró mediante la inmovilización de GOD en el electrodo AuPd/PI/rGO. El biosensor propuesto mostró buenas características de respuesta amperométrica hacia la glucosa, como una respuesta rápida en 3 s y un amplio rango lineal de 0,024 mM

a 4,6 mM. Además, el biosensor se utilizó para la detección de glucosa en suero sanguíneo humano con resultados satisfactorios.

La detección de ácidos nucleicos mediante biosensores de grafeno se puede realizar mediante técnicas amperométricas basadas en dos estrategias diferentes: (i) detección electroquímica directa de bases de ADN y polinucleótidos y (ii) seguimiento del evento de hibridación mediante marcadores electroactivos:

1. Sobre la base de la primera estrategia se pueden registrar señales electroquímicas directas durante la electro-oxidación de las cuatro bases del ADN, que se producen a diferentes potenciales (Ambrosi *et al.* 2014). Electrodos basados en grafeno han sido empleados para la detección sensible y simultánea de bases de ADN libres, así como para polinucleótidos de ADN cortos. Los electrodos de carbono modificados con rGO empleados por (Zhou *et al.* 2009) demostraron excelentes capacidades para detectar simultáneamente todas las bases de ADN. El grupo destacó la posibilidad de una detección directa de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en un oligonucleótido corto.
2. De acuerdo con la segunda estrategia, que utiliza etiquetas electroactivas, los esquemas de detección típicos implican la modificación de la superficie del electrodo con materiales de grafeno, la inmovilización de una sonda simple ssDNA, la hibridación con la cadena de ADN objetivo y la interacción específica con un portador de señal. Por ejemplo, en (Dong *et al.* 2012), se inmovilizó un electrodo de carbono modificado con rGO que contenía oligonucleótidos que portaban grupos –SH con sondas de ssDNA modificadas con nanopartículas oro (AuNP) mediante la explotación de interacciones Au–S. Posteriormente, se permitió que se hibridaran las cadenas de ADN diana marcadas con biotinas permitiendo la cuantificación del ADN objetivo hasta un nivel 5 aM (Dong *et al.* 2012).

1.4.3. Nanobiosensores basados en transistores de efecto campo

La mayoría de los biosensores nanoelectrónicos aprovechan que el evento de reconocimiento biológico produce un cambio en la carga eléctrica almacenada en las biomoléculas involucradas. Por lo tanto, el mecanismo de detección actúa de tal manera que cuando una biomolécula se une al sensor, la densidad de carga en la superficie sensora se altera y este cambio puede medirse mediante un transistor de efecto de campo (FET, *Field Effect Transistor*). Además, las modernas técnicas de fabricación nanoelectrónica (Tecnología CMOS, *Complementary-Metal-Oxide-Semiconductor*) brindan ventajas de miniaturización, detección paralela (por ejemplo, *arrays* de sensores) y capacidades para co-integrarse con circuitos y sistemas electrónicos de medida y procesado de señal. Esta última propiedad supone una gran ventaja para que los biosensores basados en dispositivos electrónicos de estado sólido compitan con otros mecanismos de bio-detección (Syu *et al.* 2018). La modulación de la conductividad por efecto del campo eléctrico es una particularidad de los materiales semiconductores con los que el grafeno guarda algunas coincidencias.

Un semiconductor es un material sólido cristalino cuya conductividad eléctrica puede modificarse varios órdenes de magnitud (desde comportarse como un aislante hasta comportarse como un buen conductor eléctrico) bajo la influencia de determinados estímulos, como campos eléctricos, magnéticos, radiación electromagnética (luz), cambios de temperatura, o añadiendo localmente pequeñas cantidades de impurezas, denominadas impurezas dopantes. Las impurezas dopantes pueden ser donadoras, que inducen un elevado número de portadores con carga negativa (electrones) en el seno del semiconductor (entonces denominado tipo N), o aceptadoras, que por el contrario inducen un elevado número de partículas móviles con carga positiva (huecos) en el seno del material (entonces denominado semiconductor tipo P).

Si se produce localmente un cambio brusco en el tipo de impureza, por ejemplo, de aceptadoras (tipo P) a donadoras (tipo N) dentro de una misma estructura monocristalina, se forma una unión PN. En el lado P, los huecos constituyen los portadores dominantes y por eso se denominan portadores mayoritarios. También existirán algunos electrones generados térmicamente en el lado P; estos se denominan portadores minoritarios. Por el contrario, en el lado N, los electrones son los portadores mayoritarios, mientras que los huecos son los portadores minoritarios. Al poner en contacto las dos zonas se establece un gradiente de concentración de electrones desde la zona N a la zona P y un gradiente de concentración de huecos desde la zona P a la zona N. Estos gradientes producen una difusión o flujo de portadores mayoritarios hacia el otro lado de la unión. El flujo de mayoritarios deja tras de sí las impurezas dopantes ionizadas, cargadas, por tanto, que no pueden moverse al estar unidas covalentemente a los átomos del semiconductor, quedando a ambos lados de la unión una zona cargada positiva en la zona N y negativa en la zona P, y vaciada de portadores de carga (fig. 10). Esta zona se conoce con el nombre de zona de deplexión o zona de agotamiento. Esta distribución de cargas fijas origina un campo eléctrico que se opone al flujo de portadores mayoritarios a través de la unión, o lo que es lo mismo, los electrones en la zona neutra de la zona N «ven» una barrera de

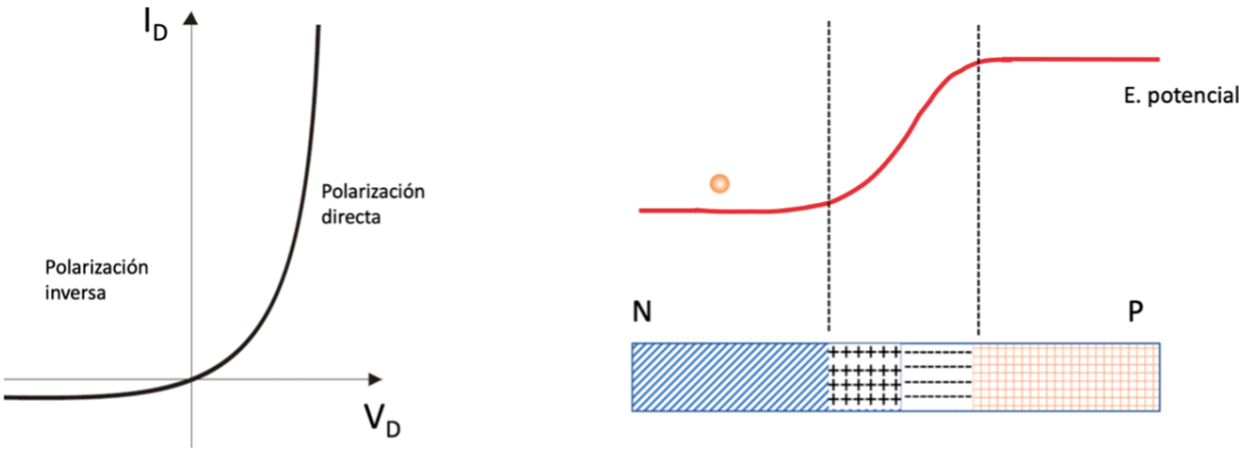


Figura 10. Izquierda, característica corriente-tensión de la unión PN. Derecha: representación esquemática de una unión PN, y barrera de potencial para los electrones en la banda de conducción

potencial cuando intentan pasar hacia la zona P que les impide el paso (equivalentemente los huecos en la zona P ven una barrera de potencial hacia la zona N).

La característica más importante de las uniones PN es su comportamiento rectificador. La parte izquierda de la figura 10 muestra las características de corriente-voltaje de una unión p-n de silicio típica. Cuando se aplica una polarización directa a la unión PN (es decir, se aplica un voltaje positivo al lado P con respecto al lado N), la mayoría de los portadores de carga se mueven a través de la unión de modo que puede fluir una gran corriente. Sin embargo, cuando se aplica una polarización inversa, los portadores de carga introducidos por las impurezas se mueven en direcciones opuestas alejándose de la unión, y solo fluye una pequeña corriente de pérdidas en el dispositivo.

En definitiva, como hemos analizado en el caso de la unión PN, combinando zonas de diferente dopado en el mismo cristal pueden generarse campos eléctricos y barreras de potencial que además pueden controlarse externamente mediante la aplicación de una tensión o corriente, modulando de esta forma el flujo de portadores de carga a lo largo del cristal. La figura 6 muestra el esquema de un transistor de efecto campo metal-oxido-semiconductor. El dispositivo está formado por dos zonas de alto dopado (fuente y drenador) separadas por una zona de dopado contrario (canal). El canal se acopla capacitivamente a través de un dieléctrico a un terminal de control denominado puerta o «*gate*». Entre las zonas de drenador y fuente que son zonas N, se establece una barrera de potencial a lo largo del canal, que es zona P. Si se aplica una tensión positiva al drenador respecto de la fuente, se establece en el canal un campo eléctrico que intenta arrastrar a los electrones desde la fuente hacia el drenador. Sin embargo, la barrera de potencial en el canal impide el flujo de electrones y por lo tanto la corriente (fig. 11, izquierda).

La altura de la barrera de potencial a lo largo del canal se puede modular con una tensión positiva aplicada al terminal de puerta. Si esta tensión es suficientemente

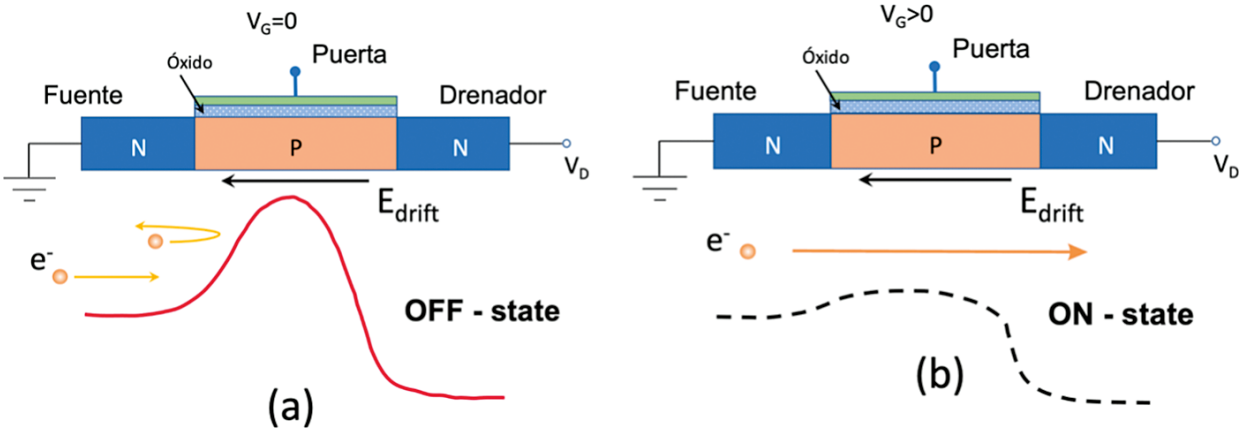


Figura 11. Esquema de un transistor MOSFET y detalle de funcionamiento: (a) estado de corte (OFF); (b) estado de conducción (ON)

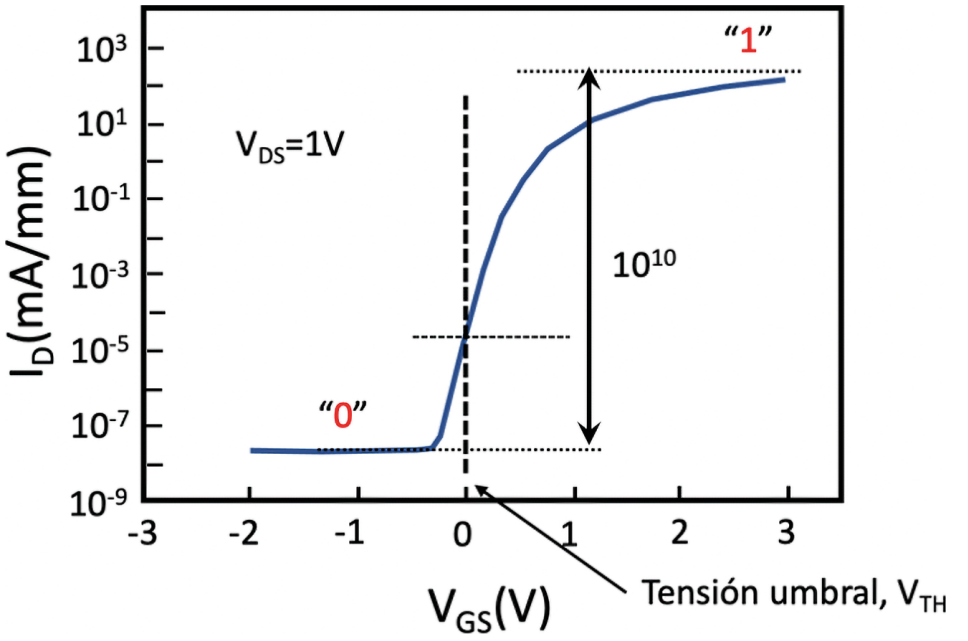


Figura 12. Característica corriente-tensión de un transistor MOSFET

grande, la barrera de potencial en el canal se reduce permitiendo el paso de electrones desde la fuente al drenador, y el establecimiento de una corriente a lo largo del dispositivo (fig. 11, derecha).

La figura 12 muestra la característica corriente-tensión de un transistor MOSFET. Cuando la tensión de puerta está por debajo de cero voltios, la corriente en el dispositivo es muy pequeña (10^{-8} mA/mm). Sin embargo, cuando se aplica una tensión de control positiva, la corriente en la estructura rápidamente aumenta hasta valores muy elevados (10^{2} mA/mm), es decir, la corriente cambia en 10 órdenes de magnitud, de manera muy rápida y con un muy pequeño aporte de energía. El voltaje de puerta mínimo necesario para conseguir una conducción apreciable en el canal de un transistor MOSFET se denomina tensión umbral (V_{TH}) (Sze *et al.* 2006).

En definitiva, el canal de un transistor MOSFET, en determinadas condiciones, se comporta como un perfecto conductor, pero si se cambia la tensión de control de manera intencionada a un valor por debajo de la tensión umbral, la misma estructura se comportará como un aislante perfecto. En definitiva, una misma estructura semiconductora nos permite representar un estado «0» o estado-OFF cuando no conduce, y un estado «1» o estado-ON cuando sí lo hace (fig. 12). Por lo tanto, usando dispositivos electrónicos construidos a partir de semiconductores es posible codificar, almacenar, procesar y transmitir toda clase de información codificada en binario, es decir, usando únicamente un código con dos estados, 0 y 1. De ahí la importancia de la Electrónica en la Tecnología de la Información.

Los transistores MOSFETs, convenientemente modificados, pueden ser también la base de un sistema de detección, es decir, de un sensor o un biosensor.

En 1970, Bergveld introdujo el concepto de transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET) (Bergveld 1970). El ISFET convencional se compone de un MOSFET con el metal reemplazado por una membrana selectiva de iones, un electrolito y un electrodo de referencia como muestra la figura 13B. Así, el óxido está directamente expuesto a los iones del electrolito cuya concentración determina la caída de potencial en la interfase electrolito-óxido. El mecanismo de detección se explica mediante el modelo de doble capa eléctrica (EDL, Electrical Double Layer) (Israelachvili 2015) (fig. 14).

Debido a las fuerzas locales de Coulomb, los iones en el electrolito se separan en tres capas: capa de Stern, capa difusa y el volumen de la disolución. La capa de Stern se forma en la superficie sólida. Los iones de la capa de Stern son atraídos por las cargas del óxido y se unen firmemente a la superficie. Por lo tanto, el potencial eléctrico decrece linealmente desde la interfase hasta la disolución. Junto a la capa de Stern, una capa difusa donde la concentración de iones cambia en función de la distancia desde la interfase. La función de concentración de iones sigue las estadísticas de Maxwell-Boltzmann y el potencial eléctrico en la capa difusa disminuye exponencialmente con la distancia desde la superficie de la interfase sólido-líquido. Finalmente, la capa más externa es el volumen de la disolución, donde la fuerza de Coulomb de la interfaz no tiene un impacto significativo en esta capa. Cabe señalar que el límite de la capa de difusión y el volumen de la disolución en equilibrio se define

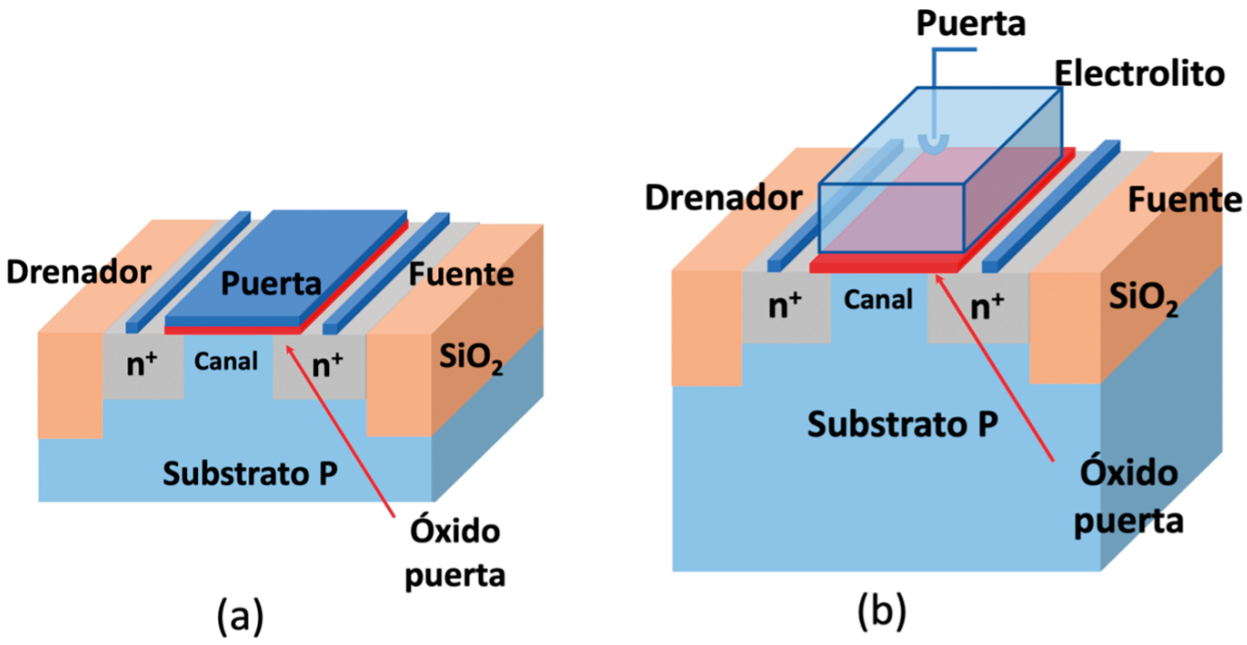


Figura 13. Transistor MOSFET con puerta metálica (a) y con puerta líquida (b)

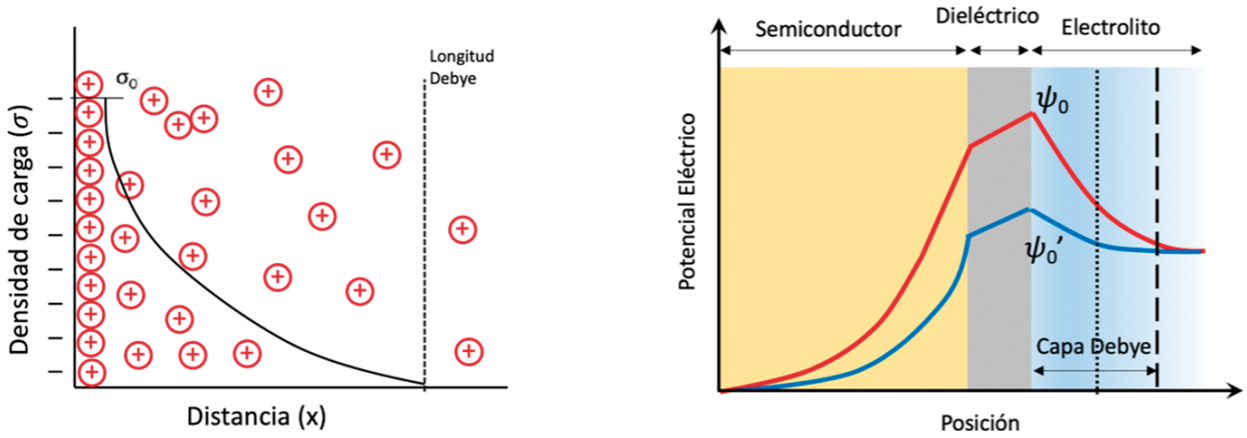


Figura 14. Modelo de doble capa eléctrica (*Electrical Double Layer,* EDL) en la interfase grafeno-electrolito: (izda.) Densidad de carga; (dcha.) Potencial (Israelachvili 2015)

por la caída del campo eléctrico en una proporción 1/e. La distancia desde la interfaz sólido-líquido hasta este límite se denomina longitud de Debye, λ_D, es decir, el punto más lejano donde las cargas de los analitos pueden afectar a las características de la superficie. El potencial de superficie ψ_0 determina la concentración de portadores en el canal, es decir, la corriente en el canal, y dependerá de la concentración de iones en la capa de Stern. Esto da como resultado una sensibilidad iónica de la corriente de drenador I_D (Shoorideh *et al.* 2012), es decir, la corriente del transistor depende de la fuerza iónica del electrolito de puerta.

En los biosensores ISFET, la capa dieléctrica (óxido) se funcionaliza con biorreceptores específicos para capturar selectivamente las biomoléculas objetivo. Las biomoléculas cargadas capturadas producen un efecto electrostático (equivalente a la modificación de la tensión de puerta o tensión umbral) que se traduce en una señal legible en forma de variación de la corriente del canal (Kaisti 2017). El dieléctrico de puerta que cubre el canal también podría ser sustituida por lípidos, polímeros, capas de moléculas *linker*, receptores y/o un electrolito, pero en todos los casos el mecanismo de transducción sigue siendo el mismo: control electrostático sobre la corriente del canal. Hasta la actualidad, se han publicado numerosos trabajos sobre aplicaciones de biodetección de dispositivos ISFETs, tanto para detectar concentración de proteínas, detección de ADN, virus, etc. Sin pretender ser rigurosos, se listan a continuación algunos de estos trabajos: (Gonçalves *et al.* 2008; Uslu *et al.* 2004; Duarte-Guevara *et al.* 2014; Lee *et al.* 2015; Lee *et al.* 2009).

2. BIOSENSORES BASADOS EN GRAFENO

2.1. El transistor de efecto campo de grafeno

Las plataformas MOSFET o ISFET utilizadas actualmente para biodetección sufren algunos inconvenientes importantes inherentes a los materiales que se emplean para su fabricación. Uno de los problemas es la escasa estabilidad de muchos materiales en el duro entorno biológico. Por ejemplo, los dispositivos fabricados con silicio están sujetos a problemas de estabilidad en ambientes acuosos (Gracia *et al.* 1993), lo que reduce su rendimiento. Además, para obtener dispositivos electrónicos de alto rendimiento con una alta relación señal-ruido, se requieren altas movilidades de los portadores de carga y bajo ruido electrónico. Sin embargo, la superficie de los materiales 3D como el silicio, y su interfaz con el dieléctrico, sufre de aspereza en la interfaz y enlaces colgantes que dan lugar a trampas en la interfaz. Estos dos hechos contribuyen a disminuir la movilidad de los electrones (Gamiz *et al.* 1996) y a aumentar el ruido de baja frecuencia, lo que dificulta el rendimiento de los biosensores FET (Deen *et al.* 2006). Finalmente, los semiconductores 3D son sólidos cristalinos rígidos con bordes afilados, dos condiciones que no son adecuadas en muchos entornos biológicos.

En los sistemas biológicos, es conocido que las prótesis rígidas y con contornos angulosos pueden provocar cicatrices y daños en los tejidos alrededor del dispositivo, haciéndolo inoperativo (Hess *et al.* 2013). Por lo tanto, es un gran desafío desarrollar sensores a partir de un material químicamente estable, que debe exhibir buenas propiedades electrónicas, permitiendo al mismo tiempo la fabricación de dispositivos pequeños y flexibles. El grafeno y otros materiales 2D cumplen con todos estos requisitos (Schmidt 2012). Además, los materiales 2D proporcionan una electrostática excelente debido a sus estructuras atómicamente delgadas y su naturaleza plana, que permiten una reducción de escala más agresiva que los semiconductores 3D. Por lo tanto, los materiales en capas 2D son deseables, lo que genera interés en los transistores FET basados en grafeno (Novoselov *et al.* 2004; Schwierz 2010; Lemme *et al.* 2007) y los biosensores FET basados en grafeno (Yang *et al.* 2010; Ang *et al.* 2008; Ohno *et al.* 2009; Dankerl *et al.* 2010; Hess *et al.* 2011; Ohno *et al.* 2010; Stine *et al.* 2012; Reiner-Rozman *et al.* 2015).

El primer transistor FET de grafeno fue reportado en 2004 por (Novoselov *et al.* 2004) (fig. 6): una capa de grafeno exfoliada se depositó en una capa de SiO_2 de 300 nm que sirvió como un dieléctrico de puerta trasera y un sustrato de silicio dopado actuando como la puerta trasera. Dichos dispositivos de puerta trasera han sido muy útiles para propósitos de prueba de concepto, pero sufren de grandes capacidades parásitas y no pueden integrarse con otros componentes. Por lo tanto, los transistores de grafeno prácticos necesitan una puerta superior. El primer MOSFET de grafeno con puerta superior fue reportado en 2007 por (Lemme *et al.* 2007) construido a partir de una capa de grafeno exfoliado mecánicamente, una capa de SiO_2 como óxido de puerta y un electrodo de puerta formado por dos láminas apiladas de Ti/Au. Posteriormente, se fabricaron otros FET de grafeno con puerta superior a partir de grafeno exfoliado (Meric *et al.* 2008) grafeno crecido por deposición química de vapor (CVD) (Salazar *et al.* 2021; Kedzierski *et al.* 2009) y grafeno epitaxial (Kedzierski *et al.* 2008; Moon *et al.* 2009), y con diferentes dieléctricos de puerta, incluido SiO_2, HfO_2, Al_2O_3.

Todos los GFET anteriores usaban sustratos de SiO_2 sobre los cuales se deposita o transfiere el canal de grafeno (exfoliado, crecido por CVD o epitaxialmente). Los sustratos de SiO_2 presentan numerosos defectos superficiales y, en consecuencia, los GFET en estos sustratos

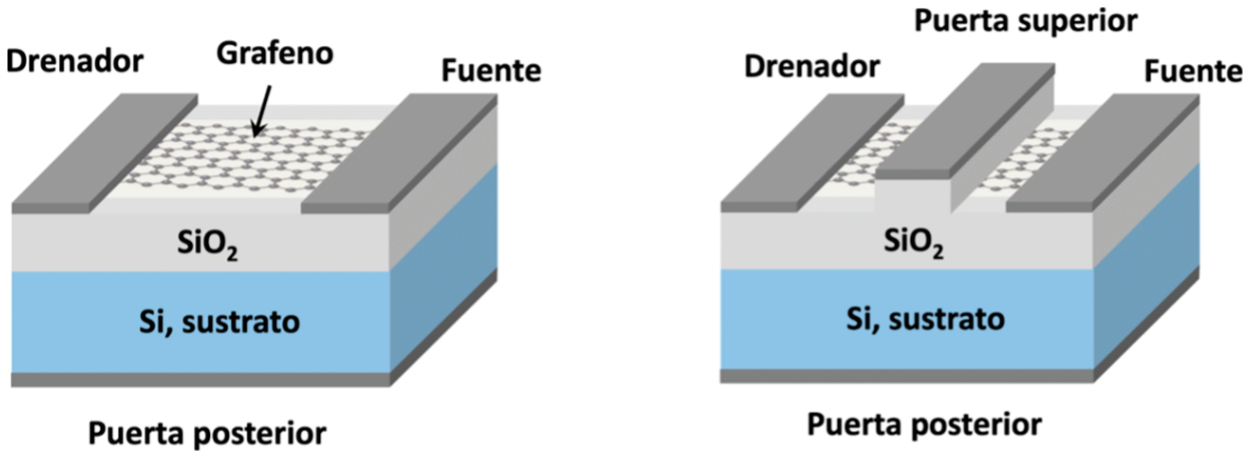


Figura 15. Transistor de efecto campo de grafeno (*Graphene Field Effect Transistor,* GFET) con puerta posterior (izda.) y puerta superior (dcha.)

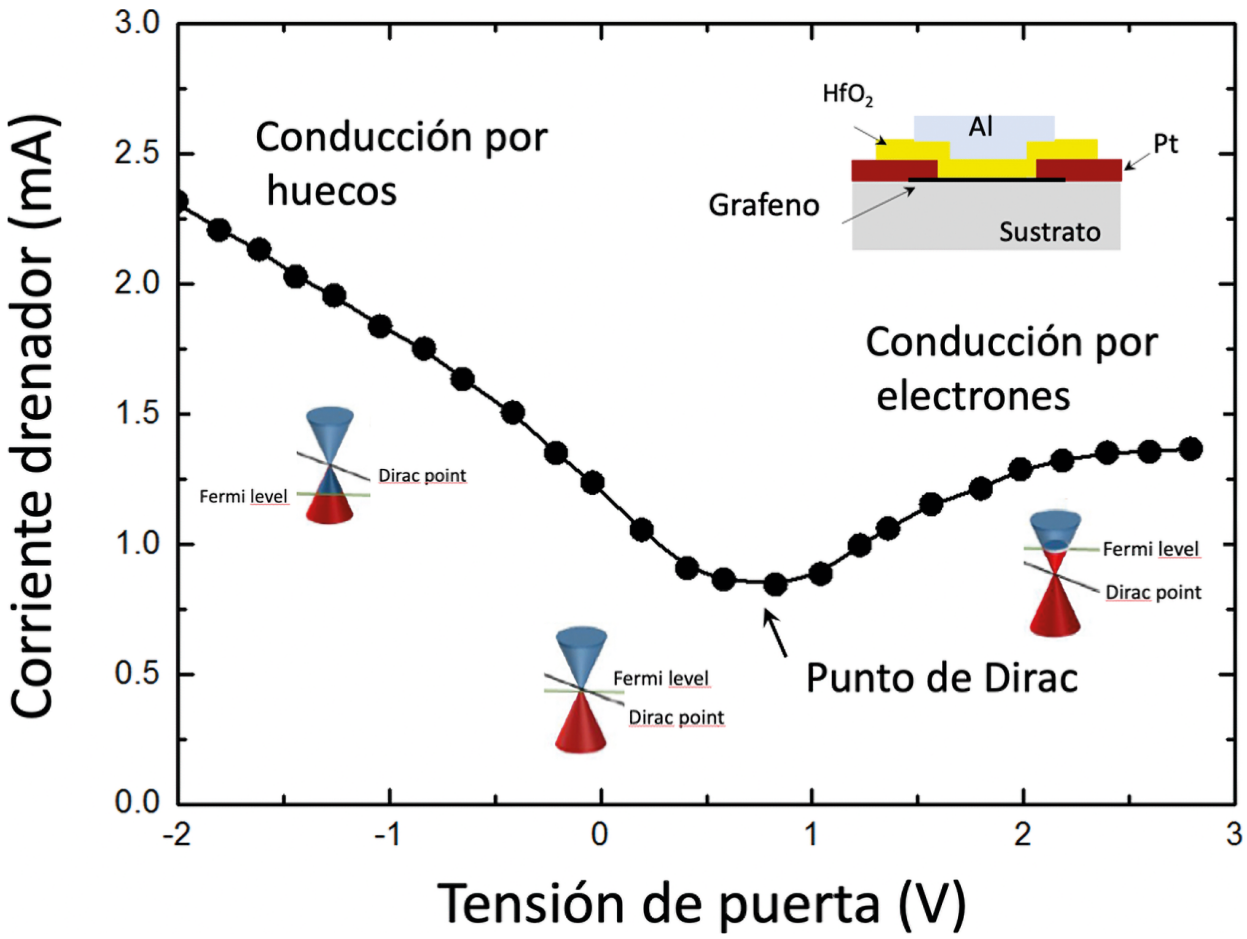


Figura 16. Característica de transferencia típica de una GFET. Se muestra el punto de Dirac (punto de mínima corriente y el comportamiento ambipolar del dispositivo. Adaptado de (Kedzierski *et al.* 2008)

exhiben características que son muy inferiores a las propiedades intrínsecas esperadas del grafeno. Algunos autores han intentado suspender el grafeno sobre el sustrato lo que conduce a una mejora sustancial en la calidad del dispositivo (Bolotin *et al.* 2008), aunque esta geometría impone severas limitaciones en la arquitectura y funcionalidad del dispositivo. Otros autores han utilizado nitruro de boro hexagonal (h-BN) como sustrato para el grafeno porque tiene una superficie atómicamente lisa que está relativamente libre de enlaces insatisfechos y trampas de carga. Los dispositivos de grafeno en sustratos de h-BN tienen niveles de corriente que son casi un orden de magnitud mejores que los dispositivos en SiO_2 (Dean *et al.* 2010).

A diferencia del silicio, la estructura de bandas del grafeno no tiene una banda prohibida que separe energéticamente a electrones y huecos (Novoselov *et al.* 2007). Como consecuencia, los transistores de efecto campo de grafeno (GFET) no presentan como los MOSFETs de silicio dos estados de conducción bien diferenciados (0 y 1) sino que siempre están en conducción (estado 1) (Schwierz 2010). La característica de corriente/voltaje de un GFET tienen una forma de V típica (Lemme *et al.* 2007; Meric *et al.* 2008; Kedzierski *et al.* 2009; Moon *et al.* 2009), mostrando un comportamiento ambipolar (Champlain 2011).

La densidad de portadores y el tipo de portador (electrones o huecos) en el canal de grafeno se rigen como en un transistor MOSFET convencional por las diferencias de potencial entre el canal y el electrodo de puerta. Los voltajes de puerta positivos producen una acumulación de electrones en el canal (canal de tipo n), y los voltajes de puerta negativos conducen a un canal de tipo p con acumulación de portadores positivos (huecos). Este comportamiento da lugar a las dos ramas de la característica de transferencia separadas por el punto de Dirac, que es el punto de mínima corriente o mínima conducción (fig. 16). La posición del punto de Dirac, V_{Dirac}, depende de varios factores: la diferencia entre las funciones de trabajo de la puerta y el grafeno, el tipo y la densidad de las cargas en las interfaces en la parte superior e inferior del canal, y cualquier contaminación del grafeno. Cuando se dopa extrínsecamente, por ejemplo, con una molécula cargada, la tensión de Dirac, V_{Dirac} cambia a

valores positivos (tipo p) o negativos (tipo n). Como tal, V_{Dirac} es una variable explotable para determinar la presencia de cargas superficiales (Stine *et al.* 2012) y ya ha demostrado ser útil para cuantificar los cambios en el pH de la solución en contacto con la superficie del canal de grafeno (Ang *et al.* 2008).

2.2. El biosensor FET de grafeno

Siguiendo la analogía entre el MOSFET y el ISFET, si el electrodo de puerta superior en un GFET se reemplaza por una solución acuosa, las moléculas cargadas dentro del medio pueden modular la conducción en el canal, dando lugar a un FET de grafeno similar al ISFET. Este dispositivo se conoce con el nombre de transistor FET de grafeno con puerta de electrolito o EGFET (*Electrolyte Graphene Field Effect Transistor*). A diferencia de los ISFET, los EGFET pueden prescindir del dieléctrico de puerta que, junto con el grosor de un átomo de la capa de grafeno, da como resultado un efecto de puerta mucho más efectivo que el de los dispositivos convencionales, porque ahora las especies cargadas (biorreceptores) que modulan el campo eléctrico pueden ser conectado directamente al canal del transistor (fig. 17). Y las capas dobles eléctricas (EDL) que se forman en las interfaces de contacto de grafeno-electrolito y electrolito-puerta, con un espesor característico dado por la longitud de Debye (λ_D) (solo unos pocos nanómetros de espesor), reemplazan el dieléctrico sólido de la puerta.

La capacitancia EDL resultante es enorme y permite operar el dispositivo a un voltaje de puerta muy bajo (V_{GS}), con una transconductancia muy alta. Además, V_{GS} se puede aplicar en un contacto retraído, colocado lejos del canal del transistor, a través de un gran volumen de solución (en comparación con el volumen definido por λ_D), porque la tensión aplicada a la puerta, $V_{GS,}$ cae esencialmente en las EDL (Veigas *et al.* 2015; Bockris *et al.* 1965; Campos *et al.* 2019).

Los EGFET detectan esencialmente los fenómenos que ocurren dentro de un volumen determinado por el ancho de la capa de Debye, cuyo valor viene dado por la expresión para una solución acuosa de iones monovalentes (Israelachvili 2015). En otras palabras, la longitud de Debye es una medida de la doble capa eléctrica formada

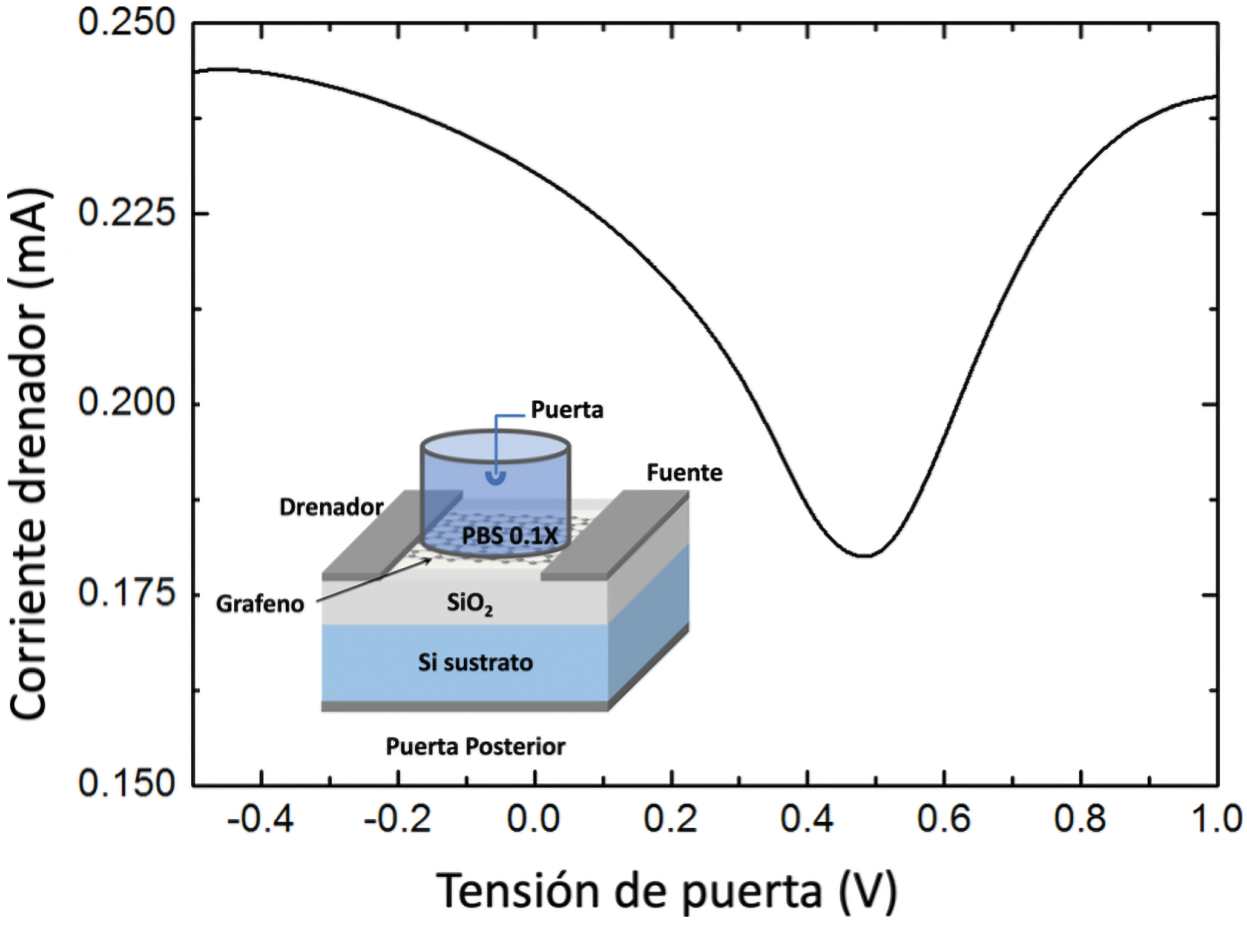


Figura 17. Característica I_D-V_G de un GFET con Puerta de electrolito (EGFET). La lámina de grafeno se creció mediante CVD y se transfirió mediante un método húmedo sobre un substrato de SiO_2/Si. El electrolito empleado es PBS 0.1X y como terminal de puerta se utilizó un electrodo de Ag/AgCl

en la superficie del grafeno, fuera de la cual las cargas están muy apantalladas y, por lo tanto, tienen un impacto mínimo en la conductancia del dispositivo FET.

En una solución fisiológicamente relevante, como una solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X, las concentraciones de sal son de 150 mM y la longitud de Debye resultante es de 0,785 nm. La longitud de Debye para una reducción de sal de 10 y 100 veces solo aumenta la distancia a ~2,5 y ~7,9 nm, respectivamente. Por lo tanto, solo aquellas cargas que residen muy cerca de la superficie del sensor dan como resultado una señal medible, lo que subraya la necesidad de localizar la molécula objetivo lo más cerca posible del sensor. Es importante destacar que esto también significa que los sensores FET pueden ser indiferentes al volumen de la disolución durante la detección y solo responderán al acoplamiento superficial de biomoléculas.

Para mejorar la selectividad, la sensibilidad y la estabilidad de los sensores basados en EGFET, normalmente se necesitan modificaciones en la superficie de las capas de grafeno en muchos casos (Yan *et al.* 2014). El grafeno podría modificarse a través de métodos covalentes y no covalentes. Sin embargo, es relativamente difícil modificar el grafeno exfoliado mecánicamente o crecido por CVD mediante unión covalente y la estructura sp2 alterada después de la modificación puede inducir cambios drásticos en sus propiedades electrónicas del grafeno. Por lo tanto, mayoritariamente se han empleado modificaciones no covalentes para preservar las propiedades intrínsecas de los materiales de grafeno originales. Las moléculas funcionales pueden unirse de forma no covalente a la superficie del grafeno a través de interacciones de van der Waals, $\pi - \pi$ o interacciones electrostáticas (Cui *et al.* 2010). Los materiales de grafeno también se pueden decorar de forma no covalente con nanopartículas mediante reducción *in situ*, electro-pulverización o deposición electroquímica (Liu *et al.* 2011).

Las ventajas de los sensores basados en EGFET de grafeno sobre los ISFET convencionales basados en silicio se pueden resumir finalmente como (Yan *et al.* 2014):

1. **Alta sensibilidad.** Un biosensor EGFET es la combinación de un sensor y un amplificador. La corriente del canal del dispositivo es muy sensible al cambio de la tensión de la puerta porque el EGFET tiene una alta movilidad de los portadores de carga, una alta capacitancia puerta-canal y, por lo tanto, una alta transconductancia.
2. **Idoneidad de la miniaturización.** Como en un transistor MOSFET, la corriente del canal del EGFET es proporcional a la relación W/L en lugar del tamaño real del dispositivo. Por lo tanto, el dispositivo se puede miniaturizar con pocos cambios en el rendimiento del dispositivo. Además, como ya se mencionó, los materiales 2D proporcionan una electrostática excelente debido a sus estructuras atómicamente delgadas y su naturaleza plana, que permiten una reducción de escala más agresiva que los semiconductores tridimensionales (Silicio, germanio, etc.).
3. **Excelente flexibilidad mecánica.** El grafeno ha mostrado una excelente flexibilidad mecánica y por lo tanto es un material ideal para la electrónica flexible (He *et al.* 2012). La integración de sensores basados en EGFET en sistemas flexibles puede encontrar algunas aplicaciones completamente nuevas en el análisis biológico o médico. En segundo lugar, los dispositivos se pueden usar en dispositivos electrónicos portátiles, ideales para el diagnóstico clínico.
4. **Buena biocompatibilidad.** Muchos experimentos han demostrado la buena biocompatibilidad de las películas de grafeno (Pinto *et al.* 2013).

Durante los últimos diez años, se han fabricado y desarrollado EGFETs para diferentes aplicaciones de detección de biomoléculas y bacterias, monitoreo de actividad celular, detección de ADN, detección de miARN, sensores de proteínas y sensores de glucosa, por ejemplo. Los EGFET logran sensibilidades similares o incluso mayores a otras técnicas de detección. Los EGFET se pueden miniaturizar e integrar fácilmente en sistemas de microfluidos, lo que presenta un gran potencial para biosensores de alto rendimiento, ultrasensibles y altamente selectivos en un amplio rango de aplicaciones (Hess *et al.* 2013; Yan *et al.* 2014; Hill *et al.* 2011; Andronescu *et al.* 2017; Mao 2018; Cinti *et al.* 2018).

Como se mencionó anteriormente, la posición del punto de Dirac en un transistor FET de grafeno puede controlarse mediante la adición de cargas eléctricas en la superficie del grafeno. La presencia de cargas positivas en la superficie desplaza el punto de Dirac hacia tensiones negativas, mientras que la presencia de cargas negativas en la superficie del grafeno desplaza el punto de Dirac hacia tensiones positivas (fig. 18B). Las biomoléculas (DNA, microRNA, proteínas, antígenos, anticuerpos, etc.) cuando se fijan a la superficie del grafeno quedan cargadas positiva o negativamente (Lin *et al.* 2013), resultando en el desplazamiento del punto de Dirac. Por lo tanto, se pueden detectar proteínas e iones mediante desplazamientos del punto de Dirac en transistores FET de grafeno (Georgakilas *et al.* 2012).

De esta forma, se han desarrollado biosensores basados en GFETs mediante la fijación de biomoléculas diana sobre la superficie del grafeno. Por ejemplo (Chang *et al.* 2012) han desarrollado un método rápido para la detección de la Escherichia Coli usando un FET de óxido de grafeno reducido (Kim *et al.* 2013) han desarrollado un GFET para detectar un biomarcador de cáncer de próstata

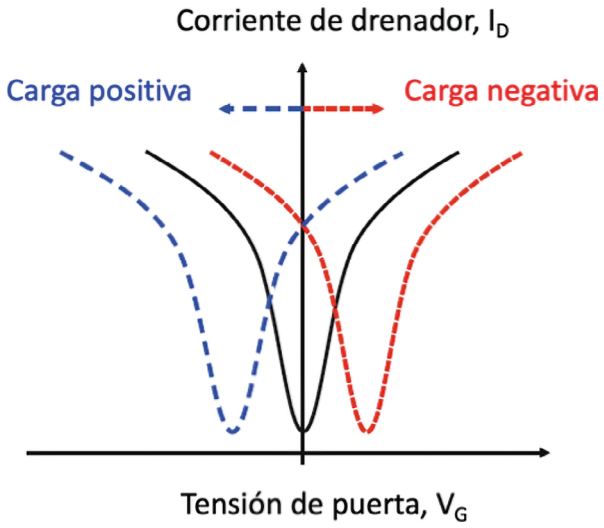


Figura 18. Desplazamiento de las características eléctricas del transistor FET de grafeno al colocar cargas en su superficie

a nivel femtomolar (Ohno *et al.* 2009) usaron un GFET con puerta de electrolito para la detección de la adsorción de proteínas sobre la superficie del grafeno sin ninguna funcionalización de grafeno (Chen *et al.* 2013) construyeron un GFET con puerta líquida sobre grafeno CVD para detección de DNA sin etiquetas (label-free DNA). La superficie de grafeno se funcionalizó con sondas de DNA para la detección del DNA diana complementario con un límite muy bajo de detección (1 pM).

Recientemente, Cai *et al.* (2014) han desarrollado un biosensor GFET a partir de óxido de grafeno reducido que permite la detección de DNA en concentraciones tan bajas como100 fM, un orden de magnitud inferior a los límites reportados en biosensores GFET de DNA previos. La reducción en el límite de detección se consigue gracias a la utilización de PNA (ácido peptidonucleico) como sonda de captura para funcionalizar la superficie del grafeno, en vez de utilizar DNA.

La detección se realiza a través de la hibridación PNA-DNA que resulta en un efecto dopante tipo p sobre el grafeno. Además, estos autores han demostrado que la respuesta del biosensor es altamente especifica, ya que la hibridación del PNA con DNA no complementario, o DNA con un error en una base, no produce respuesta alguna del sensor. Estos mismos autores, han conseguido reducir el límite de detección a 10fM, en este caso de microRNAs, usando grafeno decorado con nanopartículas de oro sobre las que fijan las sondas de PNA. Las partículas de oro actúan como amplificadoras de la respuesta biológica (Cai *et al.* 2015).

Hay muchas ventajas al usar FETs de grafeno como biosensores frente a los biosensores basados en semiconductores convencionales, nanotubos de carbono o nanohilos de silicio. La sensibilidad a cambios de carga del FET de grafeno es grande debido a que la razón área superficial/volumen del grafeno es mayor que en dispositivos de volumen. Para detectar las moléculas en una solución, los biosensores tienen que estar sumergidos en ellas. En el caso de materiales semiconductores convencionales como Si y GaAs, es necesario depositar una película de pasivación para evitar la oxidación, puesto que estos materiales se oxidan fácilmente en una solución sometidos a una tensión pequeña. Por otro lado, el grafeno

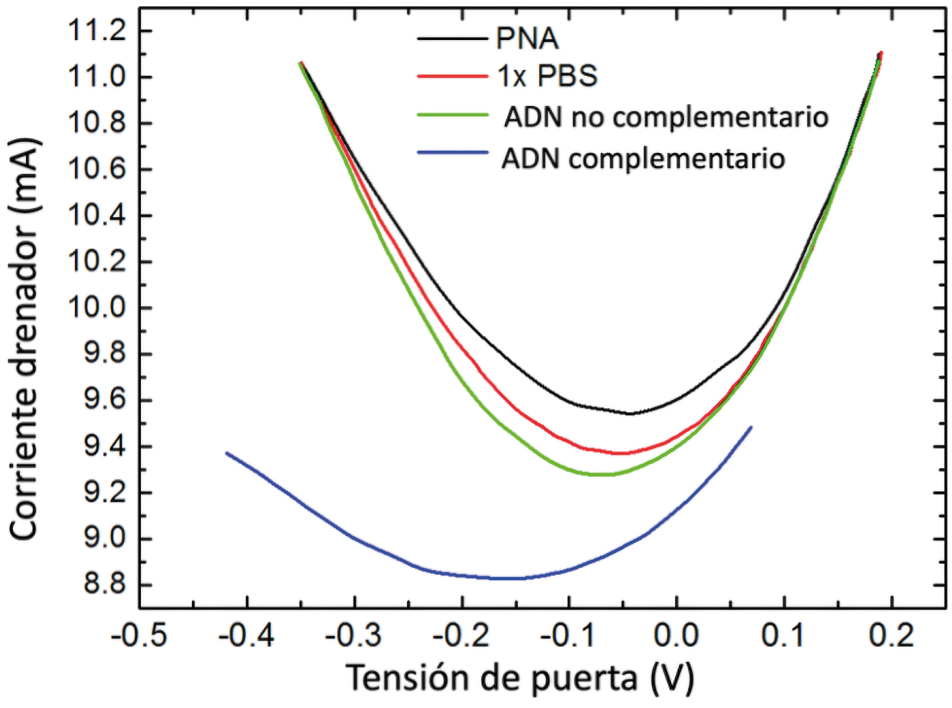


Figura 19. Corriente de drenador frente a la tensión de puerta en un EGFET para diferentes etapas de funcionalización. (Adaptado de Cai *et al.* 2014)

no se oxida fácilmente, y por lo tanto los transistores FET de grafeno pueden usarse en una solución sin pasivación alguna. Los niveles de corriente que pueden medirse en un FET de grafeno pueden ser más de 1000 veces mayor que la corriente de un nanotubo de carbono (CNT). En consecuencia, la relación señal ruido en un GFET es mucho mayor que la que se puede obtener en CNT-FETs.

3. DETECCIÓN DE SARS-COV-2 MEDIANTE BIOSENSORES BASADOS EN TRANSISTORES DE GRAFENO

3.1. Plataforma sensora UGRVID

Usando transistores FET de grafeno fabricados en el Laboratorio de Nanoelectrónica, Grafeno y Materiales Bidimensionales de la Universidad de Granada, se está desarrollando un sistema de diagnóstico de COVID-19, con la financiación de la Junta de Andalucía y el Fondo Supera COVID de la CRUE y el Banco de Santander.

El dispositivo consiste en una matriz de sensores de grafeno (varios sensores fabricados simultáneamente sobre el mismo substrato y actuando sobre la misma muestra a analizar) con un sistema microfluídico que distribuye la muestra sobre los distintos sensores. El sistema consta de un pequeño chip donde se fabrican los sensores, y donde se depositará la muestra del paciente a analizar. Este chip, que es desechable y de bajo coste, se inserta en un equipo electrónico portátil y autónomo que realiza la medida eléctrica de los sensores y proporciona el valor de la concentración de anticuerpos en saliva o plasma del paciente, de forma muy rápida a partir de la determinación de la corriente del transistor GFET (Gamiz *et al.* 2020).

El esquema de funcionamiento del sistema de detección se resume en la figura 20. El primer paso consiste en la fabricación del transistor FET de grafeno usando las técnicas microelectrónicas detalladas en las secciones anteriores. Se deposita la lámina de grafeno obtenido bien por CVD, bien por reducción de óxido de grafeno, sobre un substrato que puede ser SiO2/Si, cuarzo, o incluso un substrato flexible como poliimida. A continuación, se depositan los contactos metálicos de drenador y fuente sobre el grafeno mediante evaporación térmica en un equipo de deposición (PVD). Una vez fabricado el transistor el siguiente paso es la modificación de la superficie del grafeno con los biorreceptores, en nuestro caso, proteínas del virus, sintetizadas y aisladas en los laboratorios de la UGR y que son reconocibles por los anticuerpos que queremos detectar. Este proceso se conoce con el nombre de funcionalización de la superficie del grafeno. Una vez funcionalizado el transistor se recubre la superficie del grafeno con una solución líquida electrolítica y un electrodo metálico (Ag/AgCl) que constituirán el electrodo de control del GFET. La medida de la corriente en el dispositivo entre drenador y fuente cuando se aplica una pequeña tensión constante al drenador, mientras se varia la tensión del electrodo de control nos proporciona la característica curva I-V en forma de «V» de donde se obtiene el punto de mínima conductividad o punto de Dirac (curva de control). A continuación, se añade a la

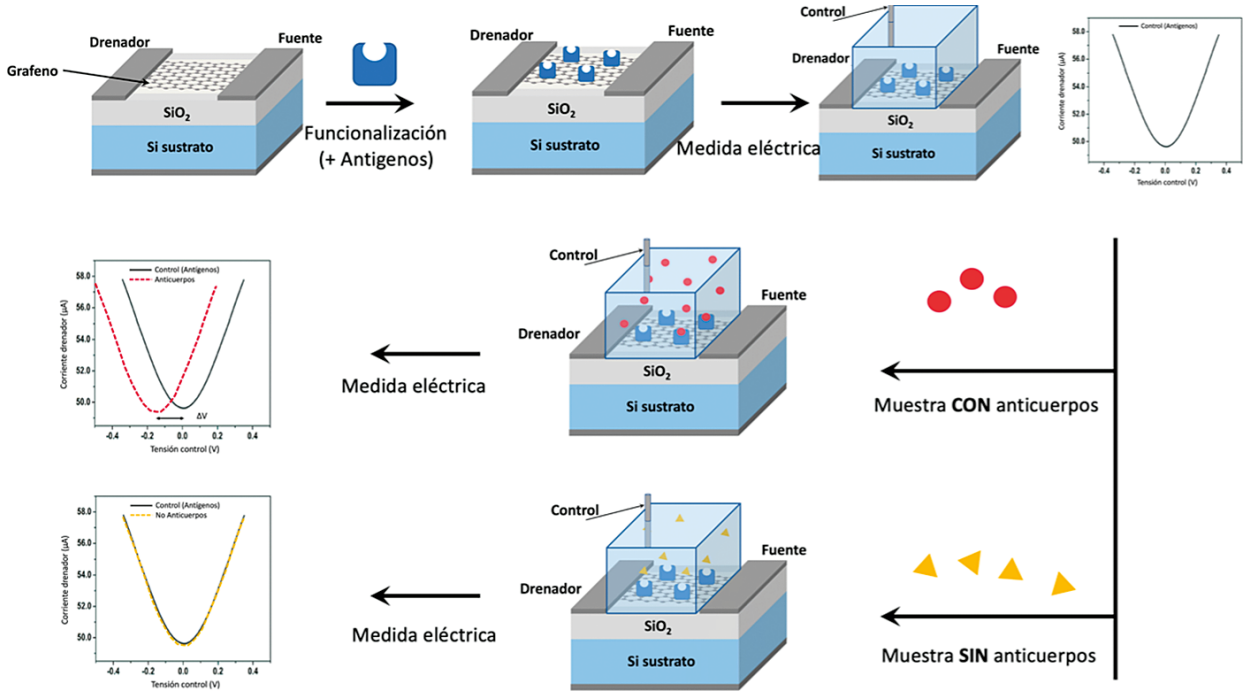


Figura 20. Esquema de funcionamiento de un biosensor de grafeno para detección de anticuerpos de COVID-19

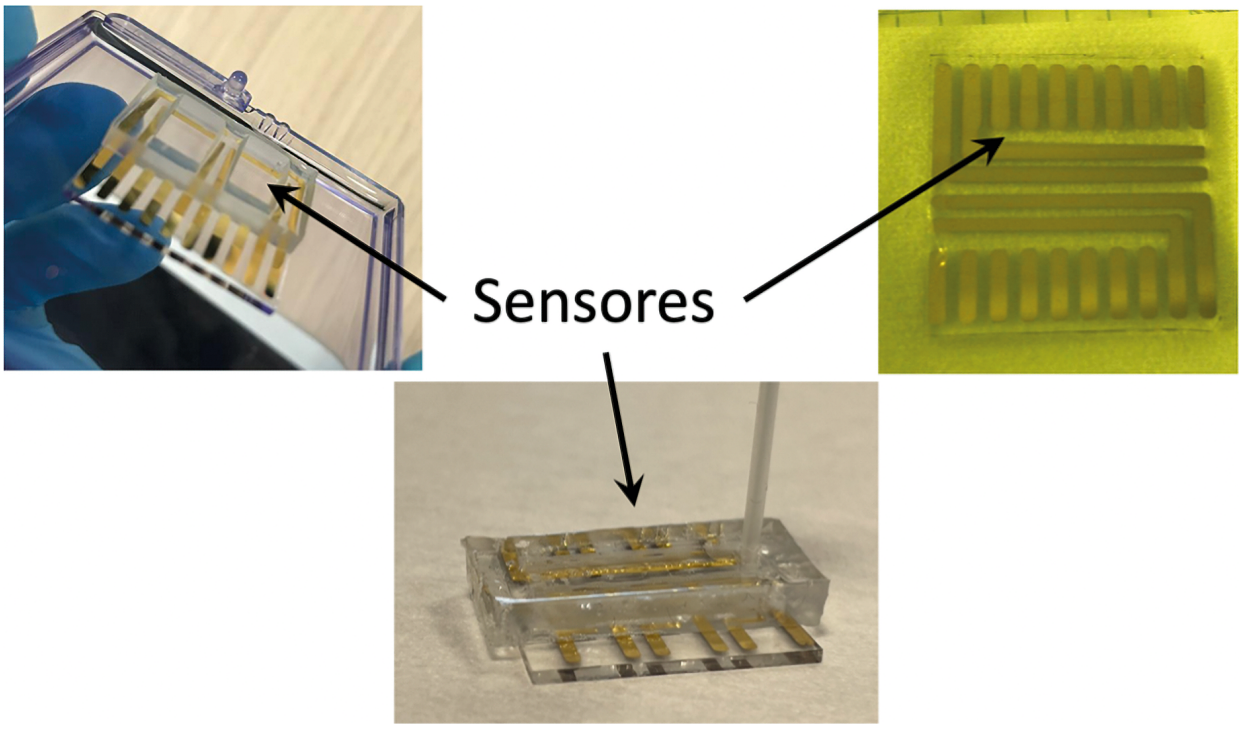


Figura 21. Diferentes plataformas sensoras conteniendo una matriz de GFETs de grafeno con 2, 6 y 16 sensores

solución electrolítica la muestra del paciente a analizar. En este momento pueden ocurrir dos casos:

a) La muestra del paciente contiene los anticuerpos frente al virus SARS-CoV-2 (representados por las esferas en la figura). En este caso, se produce la reacción antígeno-anticuerpo, ya que los biorreceptores inmovilizados en la superficie del grafeno son específicos para estos anticuerpos. Como consecuencia de esta reacción antígeno-anticuerpo, se modifica la carga eléctrica en la superficie de grafeno, y en consecuencia se produce un desplazamiento del punto de Dirac, ΔV, que además es proporcional a la cantidad de anticuerpos de la muestra analizada.
b) Por el contrario, si la muestra analizada no contiene anticuerpos específicos frente al virus SARS-CoV-2 (puede contener otros anticuerpos, representados con triángulos en la figura) no se produce la reacción antígeno-anticuerpo, y por lo tanto no se modifica la carga en la superficie de grafeno, por lo que, al medir el sensor, obtenemos una curva I-V similar a la curva de control, y sin ningún desplazamiento apreciable del punto de Dirac. De esta forma, y con una simple medida eléctrica en un dispositivo portátil puede cuantificarse la concentración de anticuerpos frente al SARS-CoV-2 de la muestra analizada.

La figura 21 muestra algunas versiones de las plataformas sensoras fabricadas junto con sus chips microfluídicos, en este caso sobre substrato de cuarzo. Cada plataforma incorpora un numero diferente de sensores con 2, 6 o 16 sensores que pueden funcionalizarse con el mismo o distinto biorreceptor para posteriormente actuar sobre la misma muestra. Los dispositivos pueden actuar como test de anticuerpos si se funcionalizan con las proteínas del virus SARS-CoV-2 o bien como test de antígenos si por el contrario sobre la superficie del grafeno se inmovilizan anticuerpos frente al virus.

La figura 22 muestra los resultados de la resistencia del canal de un EGFET en las diferentes etapas de funcionalización de su superficie y una vez en contacto con la muestra a analizar.

Una vez finalizada fabricación del sensor, se mide su resistencia de canal en función de la tensión de puerta utilizando solución tampón PBS 1X como electrolito obteniéndose una resistencia de 1.36 kΩ y una tensión de Dirac de V_{Dirac} = 0.41V. La funcionalización de la superficie del grafeno se realiza mediante la inmovilización de la proteína «spike» S1 del Sars-Cov-2. Para anclar la proteína a la superficie del grafeno se incuba la superficie del sensor durante dos horas con 1-Pyrenebutyric acid N-hydroxysuccinimide ester (PBASE). La molécula de pireno se enlaza mediante interacciones π-π (funcionalización no-covalente) con el grafeno. La modificación con pirenos produce un aumento de la resistencia del canal hasta 2.1 kΩ y un desplazamiento de la tensión de Dirac hasta V_{Dirac} = 0.33V. Una vez modificada la superficie con las moléculas ligantes (linker), se incuba el sensor con la proteína S1 *spike* del SARS-CoV-2. La fijación de

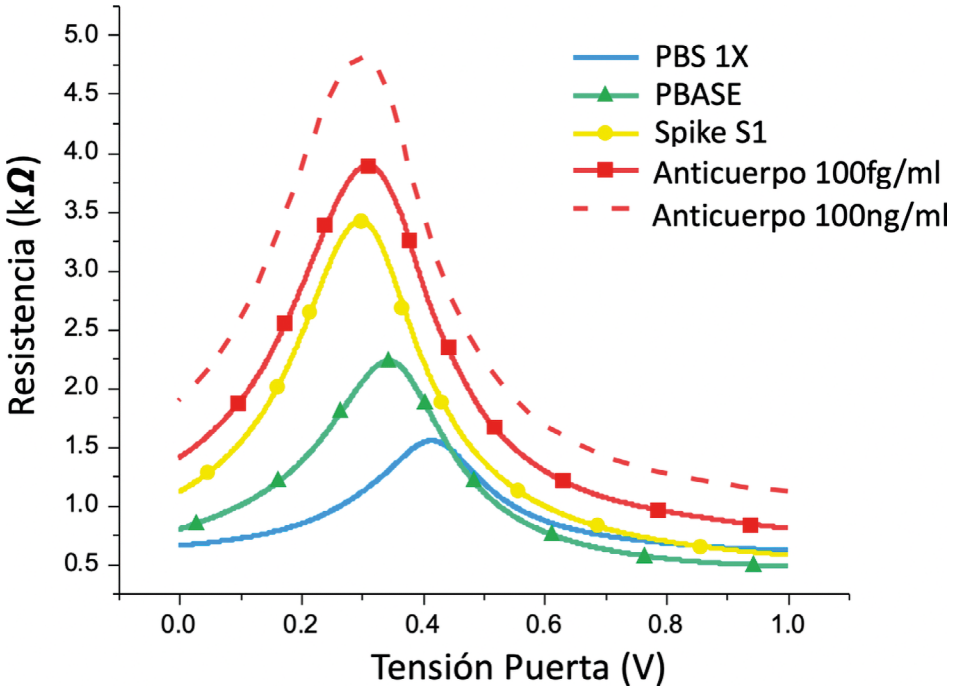


Figura 22. Resistencia del canal de un EGFET en función de la tensión de puerta para distintas

la proteína a la superficie del grafeno aumenta nuevamente la resistencia del canal del EGFET hasta un valor de 3.3 kΩ, desplazándose de nuevo la tensión de Dirac hacia la izquierda hasta V_{Dirac} = 0.30V. Este supone el punto inicial del sensor. Cuando se pone en contacto la superficie del sensor con electrolitos que no contienen anticuerpos específicos contra el SARS-CoV-2, apenas produce una modificación de la curva de medida. Sin embargo, cuando en el electrolito hay una concentración de 100fg/ml, la recombinación del anticuerpo con el antígeno (proteína S1) hace aumentar de nuevo la resistencia en el canal hasta un valor de 3.84 kΩ. Una mayor concentración de anticuerpos en el electrolito produce un aumento mayor de la resistencia del canal. Así para una concentración de 100ng/ml la resistencia del canal tiene un máximo de 4.82 kΩ. Finalmente, se midió el sensor con diferentes soluciones tampón (PBS 1X, 0.1X) negativas en anticuerpos, comprobándose que en todos los casos la curva de corriente apenas se modifica con respecto a la curva inicial. Los resultados de la figura 22 demuestran que el sensor funcionalizado con proteínas recombinantes del virus solo es reactivo a electrolitos positivos en anticuerpos del SARS-CoV-2, y que el aumento en la resistencia del canal es proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra a analizar.

Este trabajo ilustra que los biosensores basados en transistores de grafeno de efecto campo con puerta líquida son una herramienta precisa y robusta para la detección fiable y en tiempo real de enfermedades como el SARS-CoV-2. Por lo tanto, esta tecnología se presenta como una herramienta alternativa para el diagnóstico rápido con grandes perspectivas de implementación en la práctica clínica. Además, esta plataforma probada puede potencialmente servir para la detección y cuantificación de otros tipos de biomarcadores objetivo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía (proyectos CV20-36685 y PYC20-RE-023-UGR) y el Fondo Supera COVID19 de la CRUE-Banco Santander (Proyectos DRAINCOV y RAPID-19) y el Instituto de Salud Carlos III (proyecto DTS20/00038).

BIBLIOGRAFÍA

ALHAZMI, H. A., AHSAN, W., MANGLA, B., JAVED, S., HASSAN, M. Z., ASMARI, M., ... & NAJMI, A. (2022), Graphene-Based Biosensors for Disease Theranostics: Development, Applications, and Recent Advancements. Nanotechnology Reviews 11(1): 96-116.

AMBROSI, A., CHUA, C. K., BONANNI, A. & PUMERA, M. (2014), Electrochemistry of Graphene and Related Materials. Chemical Reviews 114 (14): 7150-7188.

ANDRONESCU, C. & SCHUHMANN, W. (2017), Graphene-Based Field Effect Transistors as Biosensors. Current Opinion in Electrochemistry 3(1): 11-17.

ANG, P. K., CHEN, W., WEE, A. T. S. & LOH, K. P. (2008), Solution-Gated Epitaxial Graphene as pH Sensor. Journal of the American Chemical Society 130(44): 14392-14393.

ARVINTE, A. & SESAY, A. M. (2018), Graphene Applications in Biosensors and Diagnostics, in Biosensors and Nanotechnology: Applications in Health Care Diagnostics, Ed. Zeynep Altintas, Wiley: New York, pp. 297-326.

BANICA, F. G. (2012), Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications, Wiley: West Sussex (UK).

BERGER, C., SONG, Z., LI, X., ..., CONRAD, E.H., FIRST, P.N. & DE HEER, W.A. (2006), Electronic Confinement and Coherence in Patterned Epitaxial Graphene. Science 312(5): 1191-1196.

BLANKENSTEIN, G. & LARSEN, U. D. (1998), Modular Concept of a Laboratory on a Chip for Chemical and Biochemical Analysis. Biosensors and Bioelectronics, 13(3-4): 427-438.

BOLOTIN, K. I., SIKES, K. J., HONE, J., STORMER, H. L. & KIM, P. (2008), Temperature-Dependent Transport in Suspended Graphene. Physical Review Letters, 101(9): 096802.

BOCKRIS, J. M., DEVANATHAN, M. A. V. & MÜLLER, K. (1965), On the Structure of Charged Interfaces. In *Electrochemistry*, Pergamon, pp. 832-863.

BOURLINOS, A. B., GOURNIS, D., PETRIDIS, D., SZABÓ, T., SZERI, A. & DÉKÁNY, I. (2003), Graphite Oxide: Chemical Reduction to Graphite and Surface Modification with Primary Aliphatic Amines and Amino Acids. Langmuir 19(15): 6050-6055.

CAI, B., WANG, S., HUANG, L., NING, Y., ZHANG, Z. & ZHANG, G. J. (2014), Ultrasensitive Label-Free Detection of PNA-DNA Hybridization by Reduced Graphene Oxide Field-Effect Transistor Biosensor. ACS Nano 8(3): 2632-2638.

CAI, B., HUANG, L., ZHANG, H., SUN, Z., ZHANG, Z. & ZHANG, G. J. (2015), Gold Nanoparticles-Decorated Graphene Field-Effect Transistor Biosensor for Femtomolar MicroRNA detection. Biosensors and Bioelectronics 74: 329-334.

CAMPOS, R., BORME, J., GUERREIRO, J. R., ..., G., CERQUEIRA, M. F., PETROVYKH, D. Y. & ALPUIM, P. (2019), Attomolar Label-Free Detection of DNA Hybridization with Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors. ACS Sensors 4(2): 286-293.

CEYLAN, R. F., OZKAN, B. & MULAZIMOGULLARI, E. (2020), Historical Evidence for Economic Effects of COVID-19. The European Journal of Health Economics 21(6): 817-823.

CHAMPLAIN, J. G. (2011), On the Use of the Term «Ambipolar». Applied Physics Letters 99 (12): 123502.

CHANG, J., MAO, S., ZHANG, Y., CUI, S., ZHOU, G., WU, X., YANG, C. H. & CHEN, J. (2013), Ultrasonic-Assisted Self-Assembly of Monolayer Graphene Oxide for Rapid Detection of Escherichia coli Bacteria. Nanoscale 5: 3620-3626.

CHAUHAN, N., MAEKAWA, T. & KUMAR, D.N.S. (2017), Graphene Based Biosensors – Accelerating Medical Diagnostics to New-Dimensions. Journal of Materials Research 32(15): 2860-2882.

CHEN, L., MCBRANCH, D. W., WANG, H. L., HELGESON, R., WUDL, F. & WHITTEN, D.G. (1999), Highly Sensitive Biological and Chemical Sensors Based on Reversible Fluorescence Quenching in a Conjugated Polymer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(22): 12287-12292.

CHEN, A. & CHATTERJEE, S. (2013), Nanomaterials Based Electrochemical Sensors for Biomedical Applications. Chemical Society Reviews 42(12): 5425-5438.

CHEN, T. Y., LOAN, P. T. K., HSU, C. L., LEE, Y. H., WANG, J. T. W., WEI, K. H., ... & LI, L. J. (2013), Label-Free Detection of DNA Hybridization Using Transistors Based on CVD Grown Graphene. Biosensors and Bioelectronics 41: 103-109.

CHOI, W., CHOUDHARY, N., HAN, G. H., PARK, J., AKINWANDE, D. & LEE, Y. H. (2017), Recent Development of Two-Dimensional Transition Metal Dichalcogenides and Their Applications. Materials Today 20(3): 116-130.

CHU, Y., CAI, B., MA, Y., ZHAO, M., YE, Z. & HUANG, J. (2016), Highly Sensitive Electrochemical Detection of Circulating Tumor DNA Based on Thin-Layer MoS_2/Graphene Composites. RSC Advances 6(27): 22673-22678.

CINTI, S., SCOGNAMIGLIO, V., MOSCONE, D. & ARDUINI, F. (2018), Efforts, Challenges, and Future Perspectives of Graphene-Based (Bio)sensors for Biomedical Applications. In *Graphene Bioelectronics*, Elsevier, pp. 133-150.

CRACIUN, M.F., KHRAPACH, I., BARNES, M.D. & RUSSO, S. (2013), Properties and Applications of Chemically Functionalized Graphene. Journal of Physics Condensed Matter 25(42): 423201.

CUI, Y., KIM, S. N., JONES, S. E., WISSLER, L. L., NAIK, R. R. & MCALPINE, M. C. (2010), Chemical Functionalization of Graphene Enabled by Phage Displayed Peptides. Nano letters 10(11): 4559-4565.

DAUKIYA, L., SEIBEL, J. & DE FEYTER, S. (2019), Chemical Modification of 2D Materials Using Molecules and Assemblies of Molecules. Advances in Physics 4(1): 1625723.

DANKERL, M., HAUF, M. V., LIPPERT, A., HESS, L. H., BIRNER, S., SHARP, I. D., ... & GARRIDO, J. A. (2010), Graphene Solution-Gated Field-Effect Transistor Array for Sensing Applications. Advanced Functional Materials 20(18): 3117-3124.

DEAN, C. R., YOUNG, A. F., MERIC, I., LEE, C., WANG, L., SORGENFREI, S., ... & HONE, J. (2010), Boron Nitride Substrates for High-Quality Graphene Electronics. Nature Nanotechnology 5(10): 722-726.

DEEN, M. J., SHINWARI, M. W., RANUÁREZ, J. C. & LANDHEER, D. (2006), Noise Considerations in Field-Effects Biosensors. Journal of Applied Physics 100 (7): 074703.

DONG, X., SHI, Y., HUANG, W., CHEN, P. & LI, L. J. (2010), Electrical Detection of DNA Hybridization with Single-Base Specificity Using Transistors Based on CVD-Grown Graphene Sheets. Advanced Materials 22(14): 1649-1653.

DONG, H., ZHU, Z., JU, H. & YAN, F. (2012), Triplex Signal Amplification for Electrochemical DNA Biosensing by Coupling Probe-Gold Nanoparticles–Graphene Modified Electrode with Enzyme Functionalized Carbon Sphere as Tracer. Biosensors and Bioelectronics 33(1): 228-232.

DRESSELHAUS, M. S. & ARAUJO, P. T. (2010), Perspectives on the 2010 Nobel Prize in Physics for Graphene. ACS Nano 4(11): 6297-6302.

DUARTE-GUEVARA, C., LAI, F. L., CHENG, C. W., REDDY JR, B., SALM, E., SWAMINATHAN, V., ... & BASHIR, R. (2014), Enhanced Biosensing Resolution with Foundry Fabricated Individually Addressable Dual-Gated ISFETs. Analytical chemistry 86(16): 8359-8367.

ENG, A.Y., SOFER, Z., SEDMIDUBSKÝ, D., PUMERA, M. (2017), Synthesis of Carboxylated-Graphenes by the Kolbe-Schmitt Process. ACS Nano 11(2): 1789-1797.

FILICE, M., MARCHAL, J. A. & GAMIZ, F. (2021), Biosensors Based on Two-Dimensional Materials. In 2D Materials for Nanophotonics, Elsevier, pp. 245-312.

GÁMIZ, F., ROLDÁN, J. B., LÓPEZ-VILLANUEVA, J. A. & CARTUJO, P. (1996), Coulomb Scattering in Strained-Silicon Inversion Layers on Si1–xGex Substrates. Applied Physics Letters 69(6): 797-799.

GÁMIZ, F., SAMPEDRO, C., NAVARRO, C., SALAZAR, N., DONETTI, L., MÁRQUEZ, C., ... & GALDÓN, J. C. (2020), Detección de la COVID-19 con biosensores basados en transistores de grafeno. Boletín del Grupo Español del Carbón 57: 16-25.

GAO, L., NI, G.X., LIU, B., NETO, A.H. & LOH, K.P. (2014), Face-to-Face Transfer of Wafer-Scale Graphene Films. Nature 505: 190-194.

GAUDIN, V. (2017), Advances in Biosensor Development for the Screening of Antibiotic Residues in Food Products of Animal Origin – A Comprehensive Review. Biosensors and Bioelectronics 15(90): 363-377.

GEIM, A. K. (2009), Graphene: Status and Prospects. Science 324(5934): 1530-1534.

GEIßLER, D., CHARBONNIÈRE, L. J., ZIESSEL, R. F., BUTLIN, N. G., LÖHMANNSRÖBEN, H. G. & HILDEBRANDT, N. (2010), Quantum Dot Biosensors for Ultrasensitive Multiplexed Diagnostics. Angewandte Chemie International Edition 49(8): 1396-1401.

GEORGAKILAS, G., OTYEPKA, M., ATHANASIOS, M., CHANDRA, V., KIM, N., KEMP, N., HOBZA, P., ZBORIL, R. & KIM, K.S. (2012), Functionalization of Graphene: Covalent and Noncovalent Approaches, Derivatives and Applications. Chemical Reviews 112(11): 6156-6214.

GIBSON, U. E., HEID, C. A. & WILLIAMS, P. M. (1996), A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. Genome Research 6(10): 995-1001.

GOMEZ-NAVARRO, C., WEITZ, R.T., BITTNER, A.M., SCOLARI, M., MEWS, A., BURGHARD, M. & KERN, K. (2007), Electronic Transport Properties of Individual Chemically Reduced Graphene Oxide Sheets. Nano Letters 7(11): 3499-3503.

GONÇALVES, D., PRAZERES, D. M. F., CHU, V. & CONDE, J. P. (2008), Detection of DNA and Proteins Using Amorphous Silicon Ion-Sensitive Thin-Film Field Effect Transistors. Biosensors and Bioelectronics 24(4): 545-551.

GORBALENYA, A. E., BAKER, S. C., BARIC, R., GROOT, R. J. D., DROSTEN, C., GULYAEVA, A. A., ... & ZIEBUHR, J. (2020), Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: The Species and Its Viruses – A Statement of the Coronavirus Study Group. Nature Microbiology 5 (4): 536-544.

GRACIA, I., CANE, C., LOZANO, M. & ESTEVE, J. (1993), On-Line Determination of the Degradation of ISFET Chemical Sensors. Sensors and Actuators B: Chemical 15(1-3): 218-222.

GREEN, A.A. & HERSAM, M.C. (2010), Emerging Methods for Producing Monodisperse Graphene Dispersions, Journal of Physical Chemistry Letters 1(2): 544-554.

GU, G., NIE, S., FEENSTRA, R.M., DEVATY, R.P., CHOYKE, W.J., CHAN, W.K. & KANE, M.G. (2007), Field Effect in Epitaxial Graphene on a Silicon Carbide Substrate. Applied Physics Letters 90 (1-3): 253507.

HE, R. X., LIN, P., LIU, Z. K., ZHU, H. W., ZHAO, X. Z., CHAN, H. L. & YAN, F. (2012), Solution-Gated Graphene Field Effect Transistors Integrated in Microfluidic Systems and Used for Flow Velocity Detection. Nano Letters 12(3): 1404-1409.

HESS, L. H., HAUF, M. V., SEIFERT, M., SPECK, F., SEYLLER, T., STUTZMANN, M., ... & GARRIDO, J. A. (2011), High-Transconductance Graphene Solution-Gated Field Effect Transistors. Applied Physics Letters 99(3): 033503.

HESS, L. H., SEIFERT, M. & GARRIDO, J. A. (2013), Graphene Transistors for Bioelectronics. Proceedings of the IEEE 101(7): 1780-1792.

HILL, E. W., VIJAYARAGAHVAN, A. & NOVOSELOV, K. (2011), Graphene Sensors. IEEE Sensors Journal 11(12): 3161-3170.

HUANG, T. S., TZENG, Y., LIU, Y. K., CHEN, Y. C., WALKER, K. R., GUNTUPALLI, R. & LIU, C. (2004), Immobilization of Antibodies and Bacterial Binding on Nanodiamond and Carbon Nanotubes for Biosensor Applications. Diamond and Related Materials 13(4-8): 1098-1102.

HUMMERS JR, W.S. & OFFEMAN, R. E. (1958), Preparation of Graphitic Oxide. Journal of the American Chemical Society 80(6): 1339-1339.

ISRAELACHVILI, J. N. (2015), Intermolecular and Surface Forces. 3rd Edition, Burlington, MA: Academic Press.

KAISTI, M. (2017), Detection Principles of Biological and Chemical FET Sensors. Biosensors and Bioelectronics 98: 437-448.

KARUNAKARAN, C., BHARGAVA, K. & BENJAMIN, R. (2015), Biosensors and Bioelectronics, Amsterdam: Elsevier.

KAUL, A. B. (2014), Two-Dimensional Layered Materials: Structure, Properties, and Prospects for Device Applications. Journal of Materials Research 29(3): 348-361.

KAUR, S. P. & GUPTA, V. (2020), COVID-19 Vaccine: A Comprehensive Status Report. Virus research 288: 198114.

KEDZIERSKI, J., HSU, P. L., HEALEY, P., WYATT, P. W., KEAST, C. L., SPRINKLE, M., ... & DE HEER, W. A., Epitaxial Graphene Transistors on SiC Substrates. IEEE Transactions on Electron Devices 55(8): 2078-2085.

KEDZIERSKI, J., HSU, P. L., REINA, A., KONG, J., HEALEY, P., WYATT, P. & KEAST, C. (2009), Graphene-on-Insulator Transistors Made Using C on Ni Chemical-Vapor Deposition. IEEE Electron Device Letters 30(7): 745-747.

KIM, K.S., SUH, S.B., KIM, J.C., HONG, B.H., LEE, E.C., YUN, S. *et al.* (2002), Assembling Phenomena of Calix[4]hydroquinone Nanotube Bundles by One-Dimensional Short Hydrogen Bonding and Displaced Pi-Pi Stacking. Journal of the American Chemical Society 124: 14268-14279.

KIM, D. J., SOHN, I. Y., JUNG, J. H., YOON, O. J., LEE, N. E. & PARK, J. S. (2013), Reduced Graphene Oxide Field-Effect Transistor for Label-Free Femtomolar Protein Detection. Biosensors and Bioelectronics 4: 621-626.

LEE, C. S., KIM, S. & KIM, M. (2009), Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing. Sensors 9(9): 7111-7131.

LEE, I. K., JEUN, M., JANG, H. J., CHO, W. J. & LEE, K. H. (2015), A Self-Amplified Transistor Immunosensor under Dual Gate Operation: Highly Sensitive Detection of Hepatitis B Surface Antigen. Nanoscale 7(40): 16789-16797.

LEMME, M. C., ECHTERMEYER, T. J., BAUS, M. & KURZ, H. (2007), A Graphene Field-Effect Device. IEEE Electron Device Letters 28(4): 282-284.

LI, D., MÜLLER, M. B., GILJE, S., KANER, R. B. & WALLACE, G. G. (2008), Processable Aqueous Dispersions of Graphene Nanosheets. Nature Nanotechnology 3(2): 101-105.

LI, X., ZHU, S., XU, B., MA, K., ZHANG, J., YANG, B. & TIAN, W. (2013), Self-Assembled Graphene Quantum Dots Induced by Cytochrome C: A Novel Biosensor for Trypsin with Remarkable Fluorescence Enhancement. Nanoscale 5(17): 7776-7779.

LIN, C. T., LOAN, P. T. K., CHEN, T. Y., LIU, K. K., CHEN, C. H., WEI, K. H. & LI, L. J. (2013), Label-Free Electrical Detection of DNA Hybridization on Graphene using Hall Effect Measurements: Revisiting the Sensing Mechanism. Advanced Functional Materials 23 (18): 2301-2307.

LIU, F., CHOI, J. Y. & SEO, T. S. (2010), Graphene Oxide Arrays for Detecting Specific DNA Hybridization by Fluorescence Resonance Energy Transfer. Biosensors and Bioelectronics 25(10): 2361-2365.

LIU, Z., LI, J., SUN, Z. H., TAI, G., LAU, S. P. & YAN, F. (2011), The Application of Highly Doped Single-Layer Graphene as the Top Electrodes of Semitransparent Organic Solar Cells. ACS Nano 6(1): 810-818.

LIU, X., SHUAI, H. L., LIU, Y. J. & HUANG, K. J. (2016), An Electrochemical Biosensor for DNA Detection Based on Tungsten Disulfide/Multi-Walled Carbon Nanotube Composites and Hybridization Chain Reaction Amplification. Sensors and Actuators B: Chemical 235: 603-613.

LIU, L., WARD, R.M. & SCHOMAKER, J.M. (2019), Mechanistic Aspects and Synthetic Applications of Radical Additions to Allenes. Chemical Reviews 119(24): 12422-12490.

LO GIUDICE, R. (2020), The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2) in Dentistry. Management of Biological Risk in Dental Practice. International Journal of Environmental Research and Public Health 17(9): 3067.

LU, H., STRATTON, C. W. & TANG, Y. W. (2020), Outbreak of Pneumonia of Unknown Etiology in Wuhan, China: The Mystery and the Miracle. Journal of medical virology, 92(4): 401.

LUO, X., MORRIN, A., KILLARD, A. J. & SMYTH, M. R. (2006), Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. Electroanalysis: 18(4):319-326.

MA, X., LI, F., WANG, Y. & HU, A. (2012), Functionalization of Pristine Graphene with Conjugated Polymers through Diradical Addition and Propagation. Chem Asian Journal 7(11): 2547-2550.

MA, L. P., REN, W. & CHENG, H. M. (2019), Transfer Methods of Graphene from Metal Substrates: A Review. Small Methods 3(7): 1900049.

MAIER, S. A. (2007), *Plasmonics: Fundamentals and Applications*. New York: Springer, Vol. 1, p. 245.

MAO, S. (2018), Graphene Field-Effect Transistor Sensors. In *Graphene Bioelectronics*, Elsevier: pp. 113-132.

MARQUEZ, C., RODRIGUEZ, N., RUIZ, R. & GAMIZ, F. (2016), Electrical Characterization and Conductivity Optimization of Laser Reduced Graphene Oxide on Insulator Using Point-Contact Methods. RSC Advances 6(52): 46231-46237.

MATTEVI, C. KIM, H. & CHOWALLA, M. (2011), A Review of Chemical Vapour Deposition of Graphene on Copper. Journal of Materials Chemistry 21 (3324-3334).

MCCREERY, R.L. (2008), Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. Chemical Reviews 108(7): 2646-2687.

MERIC, I., HAN, M. Y., YOUNG, A. F., OZYILMAZ, B., KIM, P. & SHEPARD, K. L., Current Saturation in Zero-Bandgap, Top-Gated Graphene Field-Effect Transistors. Nature Nanotechnology 3 (11): 654-659.

MILLMAN, J. & HALKIAS, C.C. (1967), *Electronic Devices and Circuits*, International Student Edition, New York: McGraw-Hill.

MOON, J. S., CURTIS, D., HU, M., WONG, D., MCGUIRE ... & EDDY, C. (2009), Epitaxialgraphene RF Field-Effect Transistors on Si-Face 6H-SiC Substrates. IEEE Electron Device Letters 30(6): 650-652.

NARAYANAN, T.N., VUSA, C.S. & ALWARAPPAN, S. (2014), Selective and Efficient Electrochemical Biosensing of Ultrathin Molybdenum Disulfide Sheets. Nanotechnology 25(33): 335702.

NEHRA, A. & SINGH, K. P. (2015), Current Trends in Nanomaterial Embedded Field Effect Transistor-Based Biosensor. Biosensors and Bioelectronics 74: 731-743.

NOVOSELOV, K. S., GEIM, A. K., MOROZOV, S. V., JIANG, D., ZHANG, Y., DUBONOS, S. V., ... & FIRSOV, A. A. (2004), Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. Science 306(5696): 666-669.

NOVOSELOV, K. S. & GEIM, A. K. (2007), The Rise of Graphene. Nature Materials 6(3): 183-191.

OHNO, Y., MAEHASHI, K., YAMASHIRO, Y. & MATSUMOTO, K. (2009), Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors for Detecting pH and Protein Adsorption. Nano Letters 9(9): 3318-3322.

OHNO, Y., MAEHASHI, K. & MATSUMOTO, K. (2010), Label-Free Biosensors Based on Aptamer-Modified Graphene Field-Effect Transistors. Journal of the American Chemical Society 132(51): 18012-18013.

PARK, J. & YAN, M. (2013), Covalent Functionalization of Graphene with Reactive Intermediates. Account of Chemical Research 46(1): 181-189.

PEELING, R. W., OLLIARO, P. L., BOERAS, D. I. & FONGWEN, N. (2021), Scaling Up COVID-19 Rapid Antigen Tests: Promises and Challenges. The Lancet Infectious Diseases, 21(9), e290-e295.

PEÑA-BAHAMONDE, J., NGUYEN, H. N., FANOURAKIS, S. K. & RODRIGUES, D. F. (2018), Recent Advances in Graphene-Based Biosensor Technology with Applications in Life Sciences. Journal of Nanobiotechnology 16: 75-92.

PERUMAL, V. & HASHIM, U. (2014), Advances in Biosensors: Principle, Architecture and Applications. Journal of Applied Biomedicine 12(1): 1-15.

PINTO, A. M., GONCALVES, I. C. & MAGALHAES, F. D. (2013), Graphene-Based Materials Biocompatibility: A Review. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 111: 188-202.

QHOBOSHEANE, M., SANTRA, S., ZHANG, P. & TAN, W. (2001), Biochemically Functionalized Silica Nanoparticles. Analyst 126(8): 1274-1278.

RAETHER, H. (1988), Surface Plasmons on Smooth Surfaces. In *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and On Gratings*. Springer: Berlin, Heidelberg, pp. 4-39.

REDDY, D., REGISTER L.F., CARPENTER, G.D. & BANERJEE, S.K. (2011), Graphene Field-Effect Transistors. Journal of Physics D: Applied Physics 44(31): 313001.

REINER-ROZMAN, C., LARISIKA, M., NOWAK, C. & KNOLL, W. (2015), Graphene-Based Liquid-Gated Field Effect Transistor for Biosensing: Theory and Experiments. Biosensors and Bioelectronics 70: 21-27.

ROTHAN, H. A. & BYRAREDDY, S. N. (2020), The Epidemiology and Pathogenesis of Coronavirus Disease (COVID-19) Outbreak. Journal of Autoimmunity 109(5): 102433.

SACKETT, D. L. (1975), Screening for Early Detection of Disease: To What Purpose? Bulletin of the New York Academy of Medicine 51(1): 39.

SADIK, O. A., ALUOCH, A. O. & ZHOU, A. (2009), Status of Biomolecular Recognition Using Electrochemical Techniques. Biosensors and Bioelectronics 24(9): 2749-2765.

SAHA, K., AGASTI, S. S., KIM, C., LI, X. & ROTELLO, V. M. (2012), Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. Chemical Reviews 112(5): 2739-2779.

SAINI, D. (2016), Synthesis and Functionalization of Graphene and Application in Electrochemical Biosensing. Nanotechnology Reviews 5(4): 393-416.

SALAZAR, N., MARQUEZ, C. & GAMIZ, F. (2021), Synthesis of Graphene and Other Two-Dimensional Materials. In *2D Materials for Nanophotonics*. Elsevier, pp. 1-79.

SATIJA, J., SAI, V. V. R. & MUKHERJI, S. (2012), Dendrimers in Biosensors: Concept and Applications. Journal of Materials Chemistry 21(38): 14367-14386.

SCHMIDT, C. (2012), The Bionic Material. Nature 483 (7389): S37.

SCHWIERZ, F. (2010), Graphene Transistors. Nature Nanotechnology 5(7): 487.

SHAO, Y., WANG, J., WU, H., LIU, J., AKSAY, I. A. & LIN, Y. (2010), Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. Electroanalysis 22(10): 1027-1036.

SHEN, X., XIA, X., DU, Y., YE, W. & WANG, C. (2017), Amperometric Glucose Biosensor Based on AuPd Modified Reduced Graphene Oxide/Polyimide Film with Glucose Oxidase. Journal of The Electrochemical Society 164(6): B285-B291.

SHOORIDEH, K. & CHUI, C.O., Optimization of the Sensitivity of FET-Based Biosensors via Biasing and Surface Charge Engineering. IEEE Transactions on Electron Devices 59(11): 3104-3110.

SHRUTHI, G. S., AMITHA, C. V. & MATHEW, B. B. (2014), Biosensors: A Modern Day Achievement. Journal of Instrumentation Technology 2(1): 26-39.

SCHULTZ, E., GALLAND, R., DU BOUETIEZ, D., FLAHAUT, T., PLANAT-CHRETIEN, A., LESBRE, F., ... & PERRAUT, F. (2008), A Novel Fluorescence-Based Array Biosensor: Principle and Application to DNA Hybridization Assays. Biosensors and Bioelectronics 23(7): 987.

SLOWING, I. I., TREWYN, B. G., GIRI, S. & LIN, V. Y. (2007), Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Biosensing Applications. Advanced Functional Materials 17(8): 1225-1236.

SONG, B., LI, D., QI, W., ELSTNER, M., FAN, C. & FANG, H. (2010), Graphene on Au (111): A Highly Conductive Material with Excellent Adsorption Properties for High-Resolution Bio/Nanodetection and Identification. ChemPhysChem 11(3): 585-589.

STANKOVICH, S., DIKIN, D. A., PINER, R. D., KOHLHAAS, K. A., KLEINHAMMES, A., JIA, Y., ... & RUOFF, R. S. (2007), Synthesis of Graphene-Based Nanosheets via Chemical Reduction of Exfoliated Graphite Oxide. carbon 45(7): 1558-1565.

STINE, R., MULVANEY, S. P., ROBINSON, J. T., TAMANAHA, C. R. & SHEEHAN, P. E. (2012), Fabrication, Optimization, and Use of Graphene Field Effect Sensors. Analytical chemistry 85(2): 509-521.

SYU, Y. C., HSU, W. E. & LIN, C. T. (2018), Field-Effect Transistor Biosensing: Devices and Clinical Applications. ECS Journal of Solid State Science and Technology 7(7), Q3196-Q3207.

SZE, S. M. & NG, K. K. (2006), *Physics of Semiconductor Devices*, New Jersey: Wiley.

SZUNERITS, S., MAALOULI, N., WIJAYA, E., VILCOT, J. P. & BOUKHERROUB, R. (2013), Recent Advances in the Development of Graphene-Based Surface Plasmon Resonance (SPR) Interfaces. Analytical and bioanalytical chemistry 405(5): 1435-1443.

TASIS, D., TAGMATARCHIS, N., BIANCO, A. & PRATO, M. (2006), Chemistry of Carbon Nanotubes. Chemical Reviews 106(3): 1105-1136.

TAYLOR, R. F. & SCHULTZ, J. S. (1996), *Handbook of Chemical and Biological Sensors*, CRC Press: Boca Raton, Fl.

THEVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A. & WILSON, G. S. (1999), Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Pure and Applied Chemistry 71(12): 2333-2348.

TURNER, A.P.F., KARUBE, I. & WILSON, G.S. (1987), *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford: Oxford University Press.

UMADEVI, D., PANIGRAHI, S. & SASTRY, G.N. (2014), Noncovalent Interaction of Carbon Nanostructures. Account of Chemical Research 47(8): 2574-2581.

USLU, F., INGEBRANDT, S., MAYER, D., BÖCKER-MEFFERT, S., ODENTHAL, M. & OFFENHÄUSSER, A. (2004), Label Free Fully Electronic Nucleic Acid Detection System Based on a Field-Effect Transistor Device. Biosensors and Bioelectronics 19(12): 1723-1731.

VACCHI, I.A., MÉNARD-MOYON, C. & BIANCO, A. (2017), Chemical Functionalization of Graphene Family Members. Physical Science Reviews 2(1): 20160103.

VIDAL-IGLESIAS, F. J., SOLLA-GULLÓN, J., RODES, A., HERRERO, E. & ALDAZ, A. (2012), Understanding the Nernst Equation and Other Electrochemical Concepts: An Easy Experimental Approach for Students. Journal of Chemical Education 89(7): 936-939.

VEIGAS, B., FORTUNATO, E. & BAPTISTA, P. (2015), Field Effect Sensors for Nucleic Acid Detection: Recent Advances and Future Perspectives. Sensors 15(5): 10380-10398.

WALLACE, P. R. (1947), The Band Theory of Graphite. Physical Review 71(9): 622.

WANG, J. (2005), Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. Electroanalysis: 17(1): 7-14.

WANG, Y. H., HUANG, K. J. & WU, X. (2017), Recent Advances in Transition-Metal Dichalcogenides Based Electrochemical Biosensors: A Review. Biosensors and Bioelectronics 97: 305-316.

WU, L., CHU, H. S., KOH, W. S. & LI, E. P. (2010), Highly Sensitive Graphene Biosensors Based on

Surface Plasmon Resonance. Optics Express 18 (14): 14395-14400.

WU, S., HE, Q., TAN, C., WANG, Y. & ZHANG, H. (2013), Graphene-Based Electrochemical Sensors. Small 9(8): 1160-1172.

WU, Q., SUN, Y., MA, P., ZHANG, D., LI, S., WANG, X. & SONG, D. (2016), Gold Nanostar-Enhanced Surface Plasmon Resonance Biosensor Based on Carboxyl-Functionalized Graphene Oxide. Analytica Chimica Acta 913: 137-144.

WUJCIK, E. K., WEI, H., ZHANG, X., GUO, J., YAN, X., SUTRAVE, N. & GUO, Z. (2014), Antibody Nanosensors: A Detailed Review. RSC Advances 4(82): 43725-43745.

YAN, F., ZHANG, M. & LI, J. (2014), Solution-Gated Graphene Transistors for Chemical and Biological Sensors. Advanced Healthcare Materials 3(3): 313-331.

YANG, W., RATINAC, K. R., RINGER, S. P., THORDARSON, P., GOODING, J. J. & BRAET, F. (2010), Carbon Nanomaterials in Biosensors: Should You Use Nanotubes or Graphene? Angewandte Chemie International Edition 49(12): 2114-2138.

YANG, N., CHEN, X., REN, T., ZHANG, P. & YANG, D. (2015), Carbon Nanotube Based Biosensors. Sensors and Actuators B: Chemical 207: 690-715.

YOO, S. M. & LEE, S. Y. (2016), Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. Trends in Biotechnology 34(1): 7-25.

YU, D.S., KUILA, T., KIM, N.H. & LEE, J.H. (2014), Enhanced Properties of Aryl Diazonium Salt-Functionalized Graphene/Poly(Vinyl Alcohol) Composites. Chemical Engineering Journal 245: 311-322.

ZENG, Q., CHENG, J. S., LIU, X. F., BAI, H. T. & JIANG, J. H. (2011), Palladium Nanoparticle/Chitosan-Grafted Graphene Nanocomposites for Construction of a Glucose Biosensor. Biosensors and Bioelectronics 26(8): 3456-3463.

ZHANG, J., YANG, H., SHEN, G., CHENG, P., ZHANG, J. & GUO, S. (2010), Reduction of Graphene Oxide via L-Ascorbic Acid. Chemical Communications 46: 1112-1114.

ZHANG, H., ZHANG, H., ALDALBAHI, A., ZUO, X., FAN, C. & MI, X. (2017), Fluorescent Biosensors Enabled by Graphene and Graphene Oxide. Biosensors and Bioelectronics 89: 96-106.

ZHAO, G., LI, X., HUANG, M., ZHEN, Z., ZHONG, Y., CHEN, Q. *et al.* (2017), The Physics and Chemistry of Graphene-on-Surfaces. Chemical Society Reviews 46(15): 4417-4449.

ZHOU, M., ZHAI, Y. & DONG, S. (2009), Electrochemical Sensing and Biosensing Platform Based on Chemically Reduced Graphene Oxide. Analytical Chemistry 81(14): 5603-5613.

ZHOU, Y., FANG, Y. & RAMASAMY, R.P. (2019), Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. Sensors (Basel) 19(2): 392 (29 pp).

ZHU, Y., MURALI, S., CAI, W., LI, X., SUK, J.W., POTTS, J.R. *et al.* (2010), Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. Advanced Materials 22(15): 3906-3924.

ZHU, C., DU, D. & LIN, Y. (2015), Graphene and Graphene-Like 2D Materials for Optical Biosensing and Bioimaging: A Review. 2D Materials 2(3): 32004 (18 pp).

Capítulo XXIV

Nanopartículas en la prevención, tratamiento y diagnóstico de la COVID-19

M.ª Adolfina Ruiz*, Elena Ortega y M.ª Encarnación Morales
Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Granada.
** Académica correspondiente de la Academia Iberoamericana de Farmacia*

INTRODUCCIÓN

Aunque la historia se puede escribir de muchas formas, tenemos la seguridad de que, en diciembre de 2019, en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China (Huang 2020) surge el virus coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) y, con ello, la enfermedad por coronavirus, COVID-19 (Zhongmin y Tao 2021). Este virus resultó más contagioso que sus predecesores, lo cual desató una pandemia tras cuatro meses del primer caso reportado, debido a la escalada en los casos de infecciones respiratorias. Esta neumonía atípica rememora las infecciones respiratorias emergentes de 2002 y 2012, conocidas como SARS (severe acute respiratory syndrome) y MERS (Middle East respiratory syndrome), respectivamente (de Wit *et al.* 2016). Fue el 31 de diciembre de 2019, cuando el gobierno chino informó del brote a la Organización Mundial de la Salud (OMS), señalando como agente etiológico un virus, el cual fue nombrado por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus como síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (WHO 2020). En febrero de 2020, la OMS denomina al síndrome respiratorio como enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19, por su abreviatura en inglés) (Florindo *et al.* 2020; WHO 2020).

Sería interesante preguntarnos por qué el coronavirus ataca a personas mayores más fácilmente que a otros grupos de edad. Posiblemente el hecho se deba, como resaltó el informe de Naciones Unidas, a que estas personas son un grupo vulnerable ante la enfermedad por su comorbilidad, síndromes geriátricos, un sistema inmunológico más deficiente y una fragilidad asociada al envejecimiento (Pinazo-Hernandis 2020). Sin embargo, el COVID-19 no solo es una amenaza crítica para la población con factores de riesgo, sino que genera un dramático impacto económico en términos de morbilidad y la interrupción general de las actividades económicas (Palestino *et al.* 2020). Esto se debe, en parte, a la alta transmisibilidad entre humanos. La ruta dominante para la transmisión es a través de aerosoles y gotitas en el aire. La interacción viral con los fluidos corporales, particularmente con la mucosidad, produce la interacción con las membranas celulares y eso es lo que controla su infectividad, mientras que su interacción con la piel y las superficies artificiales es menor y de ahí el empleo de desinfectantes y uso de mascarillas y otros equipos de protección personal (Singh *et al.* 2021). En consecuencia, la actual pandemia de COVID-19 provocada por el virus SARS-CoV-2 exige el desarrollo de estrategias no solo para detectar o inactivar el virus, sino para tratarlo terapéutica y profilácticamente.

Desde el momento en el que se dio a conocer el SARS-CoV2, muchos científicos del mundo comenzaron a hacer investigaciones acerca de este virus. Los biólogos moleculares, bioquímicos, químicos, analizadores de datos, científicos de inteligencia artificial, y otros investigadores/científicos de otros campos tenían un objetivo común: conocer, investigar y desarrollar herramientas contra este virus que estaba provocando una pandemia. Sin embargo, al estar en un rango nanométrico, la nanotecnología puede desarrollar o mejorar el efecto de cualquier tecnología ya existente. Por lo tanto, el papel de los nanotecnólogos es crucial, desde la prevención,



Figura 1. Aplicaciones de la nanotecnología en la COVID-19

el diagnóstico y el tratamiento de COVID-19 (Tyagi *et al.* 2021).

La nanomedicina está a punto de revolucionar la medicina a través del desarrollo de más herramientas diagnósticas y terapéuticas precisas, gracias a que este campo abarca numerosas características y disciplinas. La nanomedicina, nueva disciplina basada en la utilización de nanomateriales en aplicaciones biomédicas, se plantea como una herramienta útil en la lucha para combatir al nuevo virus SARS-CoV-2 (fig. 1), ya que se sabe que los nanomateriales pueden usarse en el diseño de sistemas de análisis y diagnosis de enfermedades; existen nanomateriales con actividad antiviral y, además, es posible utilizarlos para vehiculizar fármacos y para desarrollar nuevas vacunas efectivas. En concreto, deben enfocarse en cuatro ejes principales: a) mejora en los métodos de diagnóstico; b) desarrollo de vacunas; c) desarrollo de equipos de protección personal eficientes para salvaguardar la salud de los profesionales de la salud; d) explorar la nanocatálisis como una alternativa para eliminar al virus del aire en espacios cerrados, como aviones, oficinas, subterráneos o centros sociosanitarios (Durán Álvarez *et al.* 2020). De ahí que este trabajo pretenda resaltar los aportes que la nanociencia ha hecho, lo que se encuentra en desarrollo y lo qué puede contribuir para el seguimiento y contención de la pandemia en todos los ámbitos descritos anteriormente.

1. NANOTECNOLOGÍA

El campo de la nanotecnología ha avanzado exponencialmente en la última década y son muchos los productos

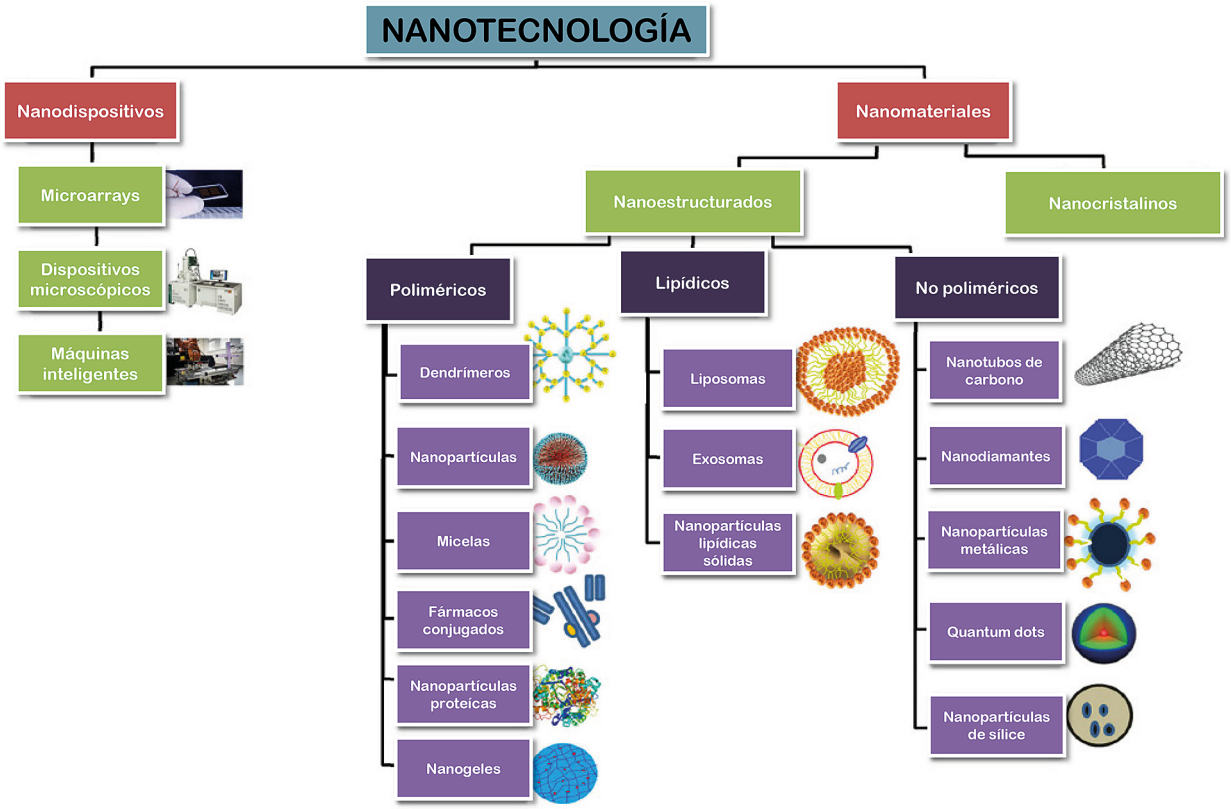


Figura 2. Clasificaciones de productos nanotecnológicos (modificado de Yetisgin *et al.* 2020)

que contienen nanopartículas. Se utilizan en diversas aplicaciones, como en alimentación, ciencia cosmética y farmacéutica (Najahi-Missaoui *et al.* 2021). La nanotecnología supone el desarrollo de herramientas a escala «nano». En ciencia, utilizamos nano cuando nos referimos a algo 1 000 000 000 de veces más pequeño que un metro. De un tiempo a esta parte están surgiendo numerosos artículos científicos que muestran cómo este tipo de tecnología puede usarse para combatir la COVID-19 (Rai *et al.* 2021).

La síntesis de nanomateriales y nanopartículas para usos médicos ha llevado a la generación de la nanomedicina, rama de la nanotecnología que tiene como objetivo utilizar las propiedades y características físicas de los nanomateriales para diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades y traumatismos, aliviar el dolor, preservar y mejorar la salud humana, utilizando herramientas y conocimientos moleculares del cuerpo humano (Kim *et al.* 2010). Esta rama de la nanotecnología se puede clasificar en dos categorías: nanodispositivos y nanomateriales (NMs). Los nanodispositivos son dispositivos en miniatura a nanoescala, incluyendo microarrays (biochips) y algunas máquinas inteligentes como respirocytes (nanomáquina capaz de comportarse como un glóbulo rojo en humanos). Por otra parte, los nanomateriales contienen partículas menores a 1000 nanómetros (nm) (Banik *et al.* 2016). El crecimiento exponencial y el creciente interés de la nanotecnología se han mejorado gracias a la capacidad de obtener imágenes de nanomateriales utilizando técnicas con capacidades de resolución atómica, como microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica en tándem (Najahi-Missaoui *et al.* 2021).

Como se observa en la figura 2, dentro de la categoría de nanomateriales, se encuentran los nanoestructurados, los cuales se dividen principalmente en tres grupos: los nanomateriales poliméricos, los no poliméricos o los formados por lípidos. Dentro de todos ellos, solamente vamos a comentar aquellos más relevantes debido a su aplicación ya sea en terapia o en diagnóstico.

Los nanomateriales exhiben diferentes propiedades dependiendo de su tamaño y funcionalidad superficial. El pequeño tamaño y la gran superficie representan el uso extensivo en diversas áreas como cosméticos, electrónica y diagnóstico y aplicaciones médicas terapéuticas. Su aplicabilidad clínica depende de diferentes parámetros, como sus propiedades físicas y químicas, la eficiencia de carga de fármacos, liberación de fármacos y, lo que es más importante, toxicidad baja o nula del propio portador (Najahi-Missaoui *et al.* 2021). A continuación, veremos que propiedades aportan cada uno de estos nanomateriales.

1.1. Nanomateriales poliméricos

a) **Dendrímeros:** Los dendrímeros son polímeros ampliamente utilizados en aplicaciones clínicas debido a su hiperramificación, estructura compartimentada, y alta monodispersidad. Controlar el número de ramas en estas nanopartículas basadas en polímeros permiten su fabricación en tamaños muy pequeños (1-5 nm). Pueden ser fabricados por polimerización en forma esférica que conduce a la formación de cavidades dentro de la molécula del dendrímero. Además, los dendrímeros contienen un extremo libre con grupos, que pueden ser fácilmente modificados/utilizados para la conjugación de compuestos biocompatibles para mejorar baja citotoxicidad y alta biopermeabilidad de la molécula. Tales modificaciones de superficie también pueden ser aplicadas para mejorar la administración específica de agentes terapéuticos. Actualmente mono o copolímeros, como polietileneimina, poliamidoamina, poli(propilenimina), quitina, etc., se utilizan para aplicaciones terapéuticas en forma de dendrímeros (Chauhan 2018).

b) **Nanopartículas** (NPs): Las nanopartículas poliméricas están formadas por la polimerización de un monómero que puede ser de origen natural o sintético. Constituyen una forma prometedora para el transporte de fármacos, debido que poseen ciertas características como no inmunogenicidad, no toxicidad y biodegradabilidad (Crucho y Teresa 2017). En cuanto a las de tipo sintético, nos podemos encontrar NPs formadas por policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), las cuales pueden presentar fenómenos de toxicidad; es por ello por lo que se recurre a materiales de origen natural como el chitosan, la albúmina o el alginato con el fin de mejorar el perfil de toxicidad, así como mejorar la eficiencia de encapsulación. Se pueden clasificar como nanocápsulas o nanoesferas en función de su composición. En nanocápsulas, una membrana de polímero única encierra al fármaco en su interior, mientras que, en las nanoesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la matriz polimérica (Letchford *et al.* 2009). Existen numerosas técnicas de preparación de este tipo de NP lo que nos va a permitir controlar las características de las mismas, además de controlar la liberación de la sustancia activa. Por último, la superficie de las nanopartículas poliméricas puede funcionalizarse con el objetivo de aumentar la especificidad en el tejido diana.

c) **Micelas**: Las micelas poliméricas se utilizan principalmente para la administración sistémica de agentes terapéuticos insolubles en agua. Tienen un tamaño inferior a 100 nm que se forma por autoensamblaje cuando se encuentran en ambiente acuoso debido a su carácter anfifílico. Se disponen formando esferas en las que los grupos hidrofílicos se disponen hacia el exterior, dejando en su interior todas las colas hidrofóbicas y por tanto nos encontramos con un núcleo lipofílico. La existencia de superficie hidrófila contribuye a su protección contra captación inespecífica por el sistema reticuloendotelial (SRE) asegurando su alta estabilidad dentro del organismo (Reichmuth *et al.* 2016). Por otro lado, el núcleo hidrófobo de las micelas poliméricas puede atrapar físicamente los agentes terapéuticos hidrofóbicos insolubles en agua. En consecuencia, la estructura dinámica de las micelas poliméricas proporciona un sistema de administración prominente para agentes terapéuticos, que permite una capacidad de carga versátil, conjugación de ligandos dirigidos y menor tasa de disolución (Mendoça *et al.* 2023).

d) **Nanogeles:** Los geles se definen como redes coloidales o poliméricas no fluidas que se hinchan cuando entran en contacto con un fluido. Un nanogel es considerado como una partícula de gel con propiedades similares, sin embargo, con un diámetro inferior a 100 nm, según la IUPAC (Alemán *et al.* 2007). La propiedad de hinchazón con tamaño flexible y alto contenido de agua de los nanogeles es el resultado de polímeros naturales o sintéticos reticulados física o químicamente. Los nanogeles tienen algunas ventajas en comparación con otros sistemas nanoportadores, como la disminución de la fuga prematura de fármacos, la encapsulación de varias moléculas terapéuticas en la misma formulación y la fácil administración a través de rutas parenterales o mucosas. Los nanogeles se utilizan en diversas aplicaciones, incluidos biosensores, separación bioquímica, cultivo celular, biocatálisis, administración de fármacos, terapia antitumoral, etc. Entre estos, la administración de terapias como ácidos nucleicos, vacunas, citoquinas y vacunas nasales son las aplicaciones más ampliamente estudiadas de nanogeles (Neamtu *et al.* 2017; Sharma *et al.* 2016).

1.2. Nanomateriales no poliméricos

a) **Nanotubos de carbono:** Son estructuras tubulares basadas en carbono de 1 nm de diámetro y 1-100 nm de longitud. Estas estructuras se pueden obtener envolviendo una sola capa de grafito llamada grafeno en un cilindro sin costuras. La configuración de los nanotubos de carbono incluye nanotubos de pared única (SWNT), nanotubos de paredes múltiples (MWNT) y fullerenos C60. El tamaño y la forma geométrica

estable de los nanotubos de carbono los convierten en un atractivo portador no polimérico para agentes terapéuticos. Pueden acceder a la célula por endocitosis o por inserción directa a través de la membrana celular. Entre las principales ventajas que encontramos para su aplicación en terapia cabe destacar que: se pueden usar para la administración de fármacos como antibióticos, agentes antivirales y anticancerígenos; además, pueden proteger el daño mitocondrial al proporcionar radicales libres (Rode *et al.* 2018).

b) **Nanopartículas metálicas:** Las NPs sólidas incluyen óxido de hierro, oro, plata y otras NPs a base de metales. Las NPs de óxido de hierro se producen conjugando un núcleo orgánico de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita (Fe_2O_3) a un polímero biocompatible. Las NPs de óxido de hierro han tenido un gran interés en la última década, principalmente debido a sus propiedades superparamagnéticas, estas pueden dirigirse a una ubicación específica en el cuerpo mediante el uso de un campo magnético externo; además, son ampliamente utilizadas en clínica como agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética (IRM) (Kyeong *et al.* 2021). Por último, se han utilizado en otras técnicas de diagnóstico e imagen debido a sus propiedades ópticas únicas que les permiten actuar como biosensores en células vivas. Las NPs inorgánicas más utilizadas en la mayoría de los trabajos desarrollados para diagnóstico y control del COVID, son las de Ag, Au (Pramanik *et al.* 2021), Cu, Cu_2O, Fe_3O_4, TiO_2... (Mallakpour *et al.* 2021). Las nanopartículas de oro (AuNP) son nanopartículas metálicas ampliamente utilizadas, dependiendo de su tamaño, forma y propiedades superficiales, se han sugerido NPs de oro para su uso en el diagnóstico del cáncer, la terapia y la radioterapia. Las NPs de oro incluso se pueden usar para desarrollar sistemas teranósticos donde el diagnóstico, la imagen y la terapéutica se pueden combinar para mejorar la terapia. Además, son ideales para el desarrollo de vacunas, porque estas nanopartículas se internalizan fácilmente a través de las células dendríticas y los macrófagos, lo que lleva a su activación. Las NPs de plata (AgNP) son otra clase de NPs metálicas que han recibido cierta atención, como biosensores debido a sus propiedades ópticas y capacidad para absorber y dispersar la luz. Las NPs de plata se utilizan en gran medida en dispositivos electrónicos, textiles, apósitos para heridas, recubrimientos antimicrobianos y dispositivos biomédicos (Montes-García *et al.* 2021).

c) **Quantum dots:** Los puntos cuánticos (QD), también conocidos como cristales semiconductores a nanoescala, son nanopartículas con propiedades ópticas y electrónicas únicas, como la fluorescencia brillante e intensiva. Dado que la mayoría de los colorantes de etiquetas orgánicas convencionales no ofrecen la posibilidad de emisión en el infrarrojo cercano (>650 nm), los QD, con sus propiedades ópticas sintonizables, han ganado mucho interés. Poseen características tales como buena estabilidad química y fotoestabilidad, alto rendimiento cuántico y emisión de luz sintonizable por tamaño. Existe un creciente interés en el desarrollo de plataformas nanoteranósticas para la detección simultánea, la obtención de imágenes y la terapia. Los QD tienen un gran potencial para tales aplicaciones, con resultados ya publicados en los campos de sensores, administración de medicamentos e imágenes biomédicas (Matea *et al.* 2017).

d) **Nanopartículas de sílice:** Estas NP ofrecen ventajas considerables en nanotecnología debido a su aplicabilidad para el diseño de sistemas complejos y a su costo-efectividad. Sus características superficiales específicas, su porosidad y su capacidad de funcionalización las convierten en herramientas atractivas para la administración terapéutica. Las nanopartículas de sílice tienen una gran superficie cubierta con grupos silanol polares, que son favorables para la adsorción de agua y mejoran la estabilidad de los agentes terapéuticos. Además, las nanopartículas a base de sílice tienen la capacidad de interactuar con los ácidos nucleicos, lo que permite su uso como vehículos de entrega dirigidos. Su tamaño y densidad de los nanoporos se pueden adaptar para lograr una tasa de entrega constante (Ortega *et al.* 2020). Además, la encapsulación de agentes terapéuticos dentro de nanopartículas a base de sílice proporciona medios sólidos para la administración de fármacos. Los poros de las nanopartículas de sílice se pueden cubrir con varias moléculas sensibles a los estímulos para aumentar la tasa de liberación de fármacos en el tejido diana. Por ejemplo, se pueden rodear de un material que sea sensible a un cambio de pH, temperatura, la presencia de algún enzima... y solamente cuando este estímulo se lleve a cabo, se degradará el material que recubre la NP y será en ese momento cuando se empiece a liberar fármaco (Mishra *et al.* 2023; Lérida-Viso *et al.* 2023; Croissant *et al.* 2017).

1.3. Nanomateriales lipídicos

Los NMs basados en lípidos incluyen una gran variedad en su estructura, pero son más típicamente aquellos que forman nanopartículas esféricas que comprenden al menos una bicapa lipídica que rodea un compartimento acuoso interno. Como sistema de entrega, las nanopartículas basadas en lípidos ofrecen muchas ventajas,

incluida la simplicidad de la formulación, el autoensamblaje, la biocompatibilidad, la alta biodisponibilidad, capacidad de transportar grandes cargas útiles y una serie de propiedades fisicoquímicas que pueden ser controladas para modular sus características biológicas. Por estas razones, las NPs basadas en lípidos son la clase más común de nanomedicamentos aprobados por la FDA (Mitchell *et al.* 2021).

a) **Liposomas:** son el ejemplo clásico de NPs basadas en lípidos. Los liposomas consisten en una bicapa de fosfolípidos y colesterol que atrapa un núcleo acuoso, como se describió por primera vez en 1965 (Bangham *et al.* 1965). Se pueden preparar con distinta estructura, composición, tamaño y flexibilidad con una variedad de moléculas lipídicas y una mayor modificación de la superficie. Estas propiedades permiten que los liposomas se acumulen en sitios específicos de la enfermedad, como los tumores, donde la capa endotelial es discontinua, falta un sistema linfático funcional y los liposomas se acumulan pasivamente a través del efecto de permeabilidad. Además, tienen la capacidad de fusionarse con la membrana celular y liberar su contenido en el citoplasma. Dependiendo del número de bicapas, se clasifican en tres tipos básicos: multilamelar, unilamelar pequeño y unilamelar grande. Las vesículas multilamelares consisten en varias bicapas lipídicas separadas entre sí por espacios acuosos. Estas propiedades estructurales les permiten transportar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. Las moléculas hidrófilas pueden transportarse en el interior acuoso del liposoma, mientras que las moléculas hidrófobas pueden disolverse en la membrana lipídica. Además, se puede cargar más de un tipo de fármaco dentro de dos compartimentos (lipídico y acuoso) o varias capas acuosas de liposomas multilamelares (Li *et al.* 2019). Esto también permite que las moléculas de fármacos diferentes se liberen en secuencia con la disociación de capas desde la capa externa hasta el núcleo interno. Los liposomas son uno de los sistemas de administración de medicamentos más utilizados, con varias formulaciones actualmente aprobadas por la FDA en uso y muchas más en ensayos clínicos o preclínicos. Los liposomas se han utilizado para la administración de fármacos, nutracéuticos y fármacos biológicos y pueden exhibir una alta eficiencia de encapsulación y un tiempo de circulación prolongado (Betty *et al.* 2010).

b) **Nanoemulsión** (NE): se ha utilizado comúnmente en la administración de vacunas y agentes anticancerígenos. Las NEs son dispersiones coloidales que pueden usarse como portadores farmacológicos de moléculas poco solubles en agua. Generalmente se componen de nanogotas de aceite dispersas en agua o nanogotas de agua dispersas en aceite. Los surfactantes generalmente se incluyen para mejorar su estabilidad. Sin embargo, una limitación clave de estos portadores es que son termodinámicamente inestables si su tamaño supera los 500 nm, siendo las NEs en el rango de 20 a 200 nm las más estables termodinámicamente. Se sugiere que las NEs son adecuadas para diversas vías de administración, incluidas la parenteral, transdérmica y ocular, principalmente debido a su capacidad para proteger los fármacos encapsulados de la degradación enzimática y la hidrólisis. Las NEs, como muchas de las NPs discutidas anteriormente, pueden modificarse conjugándolos a diferentes ligandos para unirse específicamente a células como las tumorales (Singh *et al.* 2017).

c) **Nanopartículas lipídicas sólidas:** Otro subconjunto notable de NPs basadas en lípidos se conoce comúnmente como nanopartículas lipídicas sólidas (SLNP). Han surgido como nuevos sistemas de liberación modificada para varios fármacos, incluidas las moléculas de proteínas y péptidos. Las SLNP se componen de una matriz sólida basada en moléculas lipídicas químicamente muy diferentes (por ejemplo, ceras, mezclas de mono-, di-, y triacilgliceroles, ácidos grasos) generalmente reconocidos como seguros para el organismo. Esto proporciona la ventaja de utilizar componentes fisiológicos y/o excipientes aceptados para la administración oral y tópica, reduciendo el riesgo de toxicidad aguda y crónica. Para la producción de SLNP termodinámicamente estables, necesitan ser estabilizadas por una película de moléculas de surfactante que rodea la matriz lipídica en dispersión acuosa. Los surfactantes como polisorbatos, poloxámeros y fosfolípidos son muy comunes en las formulaciones de SLNP. Las SLNP combinan las ventajas de las nanopartículas poliméricas, las emulsiones de grasa y los liposomas; pueden controlar liberación de principios activos, cambiar la distribución en el organismo, incorporar más fármacos, aumentar la solubilidad y biodisponibilidad, y proteger contra la degradación química. Además, son bien toleradas, exhiben baja toxicidad, así como buena estabilidad física y biocompatibilidad (Li *et al.* 2011; Souto *et al.* 2009).

2. VACUNAS

La generación de vacunas eficaces y seguras contra la COVID-19 en tiempo récord, han demostrado una aplicación impactante a escala global y creado conciencia sobre sus beneficios potenciales a la población (Du *et al.* 2022; Lopez-Cantu *et al.* 2022). Las vacunas basadas en la administración de partículas virales inactivas o

atenuadas son las más eficientes para generar inmunidad tanto extracelular (humoral) como intracelular, siendo las más comúnmente empleadas para inmunizar contra diferentes tipos de influenza. Dado que el genoma del SARS-CoV-2 ha sido secuenciado desde enero de 2020 (No. MN908947.3 en GenBank) (Khailany *et al.* 2020), es posible llevar a cabo cultivos en masa del virus, para posteriormente inactivarlo mediante irradiación con luz UV o reacción con formaldehido (Jiang *et al.* 2005). No obstante, en algunos casos el patógeno atenuado puede reactivarse en el cuerpo humano, trayendo consigo algunos de los síntomas de la enfermedad, por lo que los individuos con algún tipo de inmunosupresión podrían ser vacunados usando solamente cargas de virus inactivo.

El SARS-CoV-2 es un virus perteneciente al género β-coronavirus, cuyo material genético es una cadena de ácido ribonucleico (ARN). Este material genético (aproximadamente 30 kb) se halla protegido del medio por cuatro proteínas estructurales principales (Durán Álvarez *et al.* 2020), aunque, además, cuenta con 10 a 14 proteínas no estructurales o funcionales, conocidas como ORF (open reading frame), cuyas funciones permanecen aún poco conocidas (Bar-On *et al.* 2020). De todos ellas, algunos estudios han demostrado que es la proteína S un excelente objetivo para el desarrollo de vacunas; sin embargo, optimizar el diseño del antígeno es esencial para asegurar una respuesta inmune adecuada. Hasta la fecha, los estudios han utilizado la proteína S de longitud completa o regiones cuidadosamente elegidas de la misma, por ejemplo, el dominio de unión a receptores (RBD) o dominio N-terminal, que se combinan con adyuvantes con el fin de mejorar la respuesta inmunológica.

Para solventar este inconveniente recurrimos a otras posibilidades más actuales como son las vacunas basadas en el ADN o el ARN. El principal reto de las vacunas de ARN mensajero (ARNm) es la facilidad con la que el material genético puede hidrolizarse dentro y fuera de la célula, por lo que es necesario encapsularlo, darle una cubierta que lo proteja y que, a su vez, sea capaz de penetrar la doble capa lipídica de las células y liberarse en el citoplasma, algo similar al proceso de infección viral. Una de las estrategias más ampliamente utilizadas es el desarrollo de nanopartículas lipídicas (fig. 3) las cuales son capaces de unirse con el ARNm, condensando al material genético en un volumen de unos cuantos nanómetros.

Estas nanopartículas transportan al ARNm a través de las mucosas, la sangre y el espacio intersticial, dirigiéndose hacia las células objetivo con ayuda de una biomolécula (normalmente una proteína) que funciona como antena en la superficie de la nanopartícula. Esta molécula ayuda a la localización del dominio de unión con el receptor en la membrana celular para, posteriormente, ingresar por endocitosis; algo similar al proceso de entrada

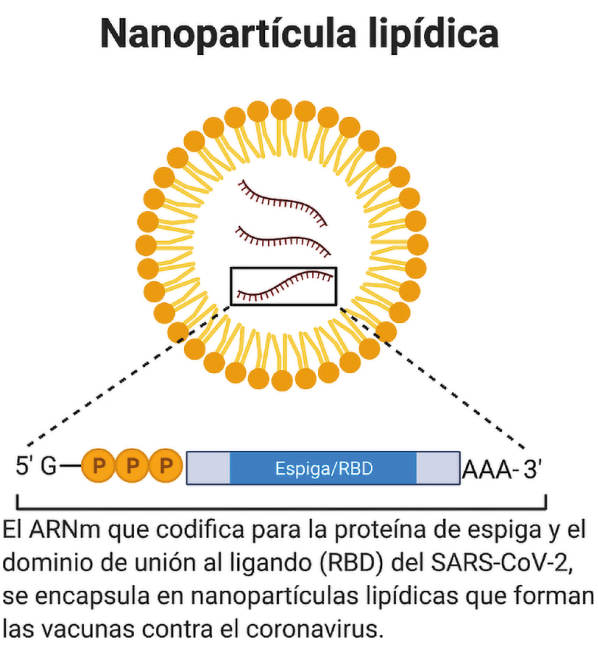


Figura 3. Nanopartícula lipídica con ARNm en el interior (modificado de Khurana *et al.* 2021)

de un virus a la célula (Du *et al.* 2022; Khurana *et al.* 2021). Sin estas nanopartículas lipídicas el ARNm se degradaría, por lo que la encapsulación les da estabilidad y les permite entrar fácilmente en las células, evitando las vías inmunes del cuerpo y llegando a los tejidos diana de manera efectiva sin ser eliminadas por los órganos y sistemas de nuestro organismo.

BioNTech, fundada en 2008, y Moderna, fundada en 2010, investigaron como usar ARNm para producir cualquier proteína en el cuerpo, ya sea como terapia o como vacuna. A pesar del escepticismo inicial, las vacunas contra la COVID-19 de ARNm producidas por Pfizer/BioNTech y Moderna han sido uno de los avances científicos más revolucionarios en el último año, dejando las puertas abiertas a la nueva generación de vacunas y otros tratamientos. Tenemos que recordar que los nanomateriales ya han jugado un papel clave en la lucha contra el SARS-CoV-2. Todas estas vacunas dependen de nanopartículas para transportar el ARNm al interior de las células y conseguir la inmunización (Pramanik *et al.* 2021). Una de las ventajas de usar NPs en la preparación de vacunas es una mejora de la antigenicidad de los agentes conjugados o adsorbidos. En este caso, pueden actuar como virus en forma de patógeno. Las NPs también pueden ser efectivas para estimular los sistemas inmunes innatos y adaptativos. Finalmente, las NPs desempeñan un papel esencial en la entrega de antígenos como portadores debido a su eficiente orientación celular y propiedades de liberación controlada. Sin embargo, las vacunas basadas en NPs tienen algunas limitaciones, una de las principales, es su toxicidad celular y la necesidad de un adyuvante

para hacer que la vacuna sea más efectiva, así como, la necesidad de dosis múltiples, una respuesta inmune retardada y múltiples efectos secundarios. Además, el tamaño, la forma, la carga y el área de superficie de las NPs tienen un efecto significativo en el rendimiento de la vacuna (Jafari *et al.* 2022).

El desarrollo de estas vacunas no hubiese sido posible sin años de perseverancia en la nanotecnología, miles de millones de dólares de inversión y trabajos previos con otros coronavirus que proporcionaron una plataforma de lanzamiento, que ha hecho que en menos de un año se haya demostrado que las vacunas de ARNm actuales contra la COVID-19 sean seguras y efectivas. Pero sin duda, queda mucho por hacer.

3. TRATAMIENTO

Las investigaciones continuas conllevan a mejoras en los agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades. Aunque sigue existiendo un problema para llegar a conseguir el tratamiento ideal, basado en que no se llega a conseguir una acción selectiva del principio activo en el lugar de acción. La aplicación de los agentes terapéuticos convencionales tiene limitaciones tales como la no selectividad, efectos secundarios indeseables, baja eficiencia y mala biodistribución. Por lo tanto, el enfoque de las actividades de investigación actuales es diseñar sistemas de entrega bien controlados y multifuncionales.

La asociación de agentes terapéuticos con nanopartículas con propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas y el diseño de sus vías para una orientación adecuada es un enfoque prometedor en la entrega de moléculas a ciertos lugares del organismo. Esta estrategia dirigida mejora la concentración del agente terapéutico en las células/tejidos; por lo tanto, se pueden utilizar dosis bajas, particularmente cuando los efectos secundarios son indeseados. El aumento de la concentración de agentes terapéuticos en la diana, también mejora su índice terapéutico al mejorar la eficiencia y/o aumentar la tolerabilidad en los sistemas biológicos. Los agentes terapéuticos insolubles en agua también se pueden combinar con nanopartículas, que pueden protegerlas de las barreras fisiológicas y mejorar su biodisponibilidad. Las ventajas antes mencionadas permiten la utilización de nanopartículas terapéuticas dirigidas en diversos campos de la medicina (Yetisgin *et al.* 2020).

Las nanopartículas también se muestran prometedoras como vehículos para fármacos antivirales que sirvan no para prevenir la COVID-19, como las vacunas, sino para tratar a personas que ya la tienen. De hecho, algunos nanomateriales han conseguido alterar la membrana viral para prevenir infecciones (Tang *et al.* 2021). Muchos virus, incluido el SARS-CoV-2, están cubiertos por una membrana que es esencial para que el virus logre infectar nuestras células. En la tabla 1, se recogen los principales efectos antivirales de las nanopartículas.

Sin embargo, como todo en la vida, existen limitaciones y dudas por resolver. ¿Se acumulan las nanopartículas? ¿Se eliminan del organismo? ¿Cómo? (Peplow 2021).

Las nanopartículas de la compañía NanoViricides, tienen como objetivo romper las membranas virales utilizando detergentes encapsulados en nanopartículas que dañan la membrana del virus, con lo que ya no podría infectar. Las nanopartículas diseñadas contenían además el antiviral Remdesivir, con lo que el efecto contra el virus era doble (Zarubova *et al.* 2021). Otra ventaja que proporcionan estos materiales es que una vez diseñados, pueden producirse muy rápidamente y tener actividad en una amplia gama de virus.

Otros medicamentos que han sido probados para el tratamiento de la COVID-19, son fármacos como mesilato de camostat, azitromicina, hidroxicloroquina, lopinavir ivermectina, remdesivir, tocilizumab y sarilumab que han sido propuestos para bloquear la fusión del virus con las células huésped, la replicación viral y la infección en general. En este sentido, las nanopartículas inorgánicas funcionalizadas pueden llevar los fármacos y dirigirlos de manera eficiente a las células afectadas por el SARS-CoV-2, principalmente los neumocitos tipo II.

Un estudio realizado por Silvia de Barros y colaboradores (de Barros *et al.* 2022) muestra como han desarrollado dos nanosistemas basados en nanopartículas poliméricas y nanomicelas cargadas con los fármacos hidroxicloroquina y azitromicina. Obtuvieron unos nanotransportadores con unas características satisfactorias en cuanto a tamaño y eficiencia de encapsulación. Además, resultaron no ser citotóxicas para las células, incluso, a altas concentraciones. Por último, demostraron como la vía pulmonar es una vía apta para la administración de este tipo de transportadores de fármacos.

La cloroquina, otro de los fármacos sugeridos para el tratamiento contra el SARS-CoV2 debido a sus propiedades para bloquear la entrada del virus en la célula, fue encapsulado satisfactoriamente en nanopartículas poliméricas de ácido poliláctico (PLA) (Lima *et al.* 2018).

Basado también en la nanotecnología, se encuentra un nuevo tratamiento cuya finalidad es crear «nanotrampas» que se unirían al virus SARS-CoV-2 y luego usar el propio sistema inmunológico del organismo para destruirlo (fig. 4). Estas ***Nanotraps*** («nanotrampas») atraen al virus imitando las células diana que el virus infecta. Cuando el virus se une a las Nanotraps, estas secuestran el virus de otras células y lo atacan para que el sistema inmunológico lo destruya.

Aunque la terapia permanece en las primeras etapas de prueba, los investigadores prevén que podría administrarse

Tabla 1. Efectos antivirales de las nanopartículas. Modificado de (Vahedifard *et al.* 2021)

Mecanismo de acción	Ejemplos
Nanopartículas que bloquean la unión celular y la entrada viral	• Titanio (Ti), plata (Ag), oro (Au) y zinc (Zn) • Puntos de carbono catiónicos (CDs) sintetizados a partir de la curcumina (CCM-CDs) • AgNPs modificados con curcumina (cAgNPs) • NP de silicio (SiNPs) • Mesoporoso-SiO2 (mSiO2) • NP de selenio • Los QD de grafeno pueden inhibir la unión celular del VIH
Nanopartículas que bloquean la replicación y la proliferación viral	• AgNPs y SeNPs • AuNPs • Ag2S • CD derivados de monómeros de benzoxamina
Nanopartículas para inactivación viral y con poder viricida	• AuNPs • Nanodiscos funcionalizados con receptores de virus • Ferromagnético Fe3O4 • AuNPs
Administración de agentes antivirales	• Nanoencapsulación • NP poliméricos • Conjugados de triazol de nanopartículas-péptidos de oro • PNPs basados en PLGA • NP liposomales catiónicas • Las nanopartículas que imitan el virus • Las poliamidoaminas (PAMAMs)
Estrategias de nanomedicina para atacar el sistema inmunológico	• Tocilizumab (un antagonista de la IL-6) más hialuronato-oro NPs • Dexametasona liposomal • LIF nano • Adenosina
Nanopartículas que combinan múltiples enfoques para tratamiento	• Combinación de QD de carbono (CQD) • Nanoformulación híbrida multifuncional lípido-polímero • Partículas similares a virus (VLP) y virosomas
Nanosoluciones adicionales para COVID-19	• Partículas similares a virus (VLP) y virosomas • Nanosoluciones adicionales para COVID-19 • Nanomedicina regenerativa • Secretoma mesenquimal de células madre • Exosoma

mediante un aerosol nasal como tratamiento para la COVID-19. En concreto, se trata de unas nanopartículas con una alta densidad de proteínas ACE2 en su superficie.

Del mismo modo, diseñaron otras nanopartículas con anticuerpos neutralizantes en sus superficies. Estos anticuerpos se crean dentro del cuerpo cuando alguien está infectado y están diseñados para adherirse al coronavirus de varias maneras. Las NPs están elaboradas con polímeros y fosfolípidos aprobados por la FDA, y tienen un tamaño de unos 500 nanómetros de diámetro, mucho más pequeñas que una célula. Eso significa que las Nanotraps pueden llegar a más áreas dentro del organismo y atrapar el virus de manera más efectiva. En teoría, las Nanotraps también podrían usarse en variantes del virus, lo que conduciría a una nueva forma potencial de inhibir el virus en el futuro (Chen *et al.* 2021).

Una empresa norteamericana, Cellis Therapeutics, está ensayando nanopartículas que contienen las proteínas ACE2 y CD147. Se trata de las dos proteínas que usa el coronavirus SARS-CoV-2 para entrar en nuestras células. Cuando estas estructuras encuentran al virus, lo atrapan mediante la unión a esas proteínas, evitando que esa partícula viral siga infectando (Chen *et al.* 2021).

Otra empresa australiana, Starpharma, probó su nanoestructura en forma de aerosol nasal contra el coronavirus SARS-CoV-2 en un modelo de ratón. La administración del aerosol nasal antes y después de la exposición al SARS-CoV-2 redujo las cargas virales en la

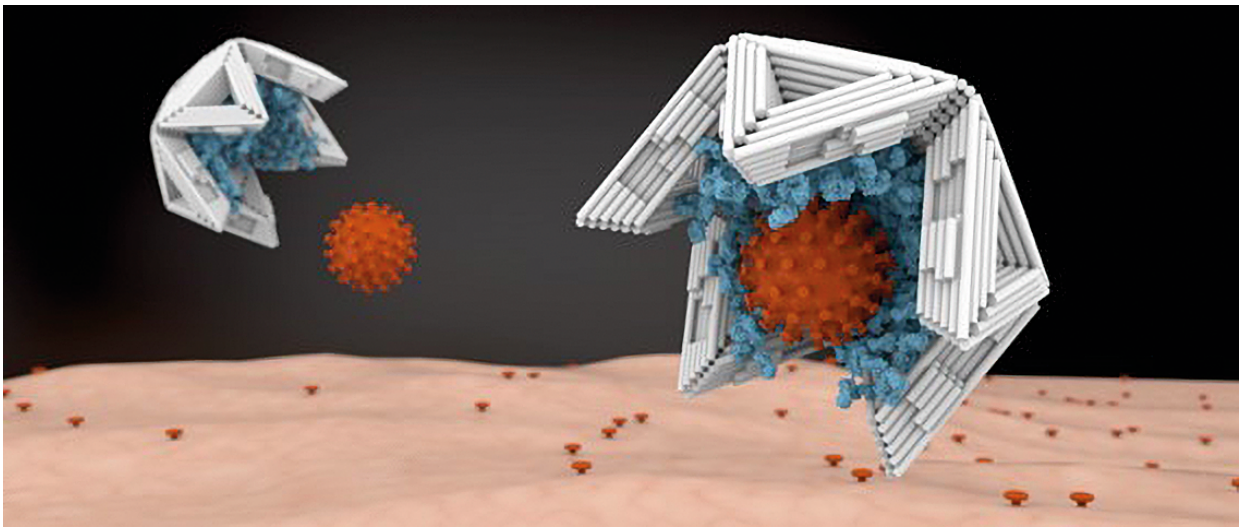


Figura 4. Representación Nanotraps captando una unidad de SARS-CoV2. Créditos de la imagen: Elena-Marie Willner/ Dietz Lab / TUM (Peplow 2021)

sangre, los pulmones y la tráquea de los animales en más de un 99 % (Paull *et al.* 2021). Sin duda alguna creemos que el potencial de la administración nasal como vía de considerable interés para diversos fármacos con actividad contra la COVID-19 debido a que ofrece ventajas que otras vías y tratamientos no las tienen. Por ejemplo, para la administración de anticuerpos monoclonales por vía parenteral es una técnica, cara, no disponible universalmente y difícil de administrar, ya que requiere de material y personal cualificado. En cambio, la vía nasal, ofrece una alternativa económica y con la posibilidad de ser administrado en casa por el propio paciente (Ezer *et al.* 2021).

4. DIAGNÓSTICO

La eficiencia en el diagnóstico ha sido sustancial para promover la prevención, el seguimiento y la contención de brotes epidémicos. Este paso es crucial para obtener información que permita tomar las medidas sanitarias necesarias para que el sistema de salud provea atención adecuada a los infectados sin llegar a colapsar. Así, es posible asegurar atención a los pacientes en diferentes etapas de la enfermedad.

El uso de nanomateriales como el grafeno, nanopartículas de metales nobles (oro y plata), nanopartículas magnéticas (óxido de hierro y perlas magnéticas) y nanopartículas fluorescentes (moléculas fluorescentes y puntos cuánticos) en general, están jugando un papel clave en la prevención de la propagación del virus (Gowri *et al.* 2021).

Los nanobiosensores y las nanopartículas de oro se utilizan en dispositivos de prueba de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa) que se utilizan para la detección de coronavirus. Sin duda todos estos nanomateriales de una manera importante están contribuyendo en la lucha contra este virus (Ramaiah *et al.* 2021).

4.1. Test rápidos

Los test de autodiagnóstico para la detección del SARS-CoV-2 han constituido una herramienta fundamental en la lucha contra la pandemia, puesto que permiten un diagnóstico rápido de la COVID-19 sin necesidad de enviar las muestras a laboratorios de análisis.

Los ensayos comerciales de flujo lateral contienen una membrana similar a una tira de papel recubierta con dos líneas: una contiene nanopartículas de oro con anticuerpos conjugados; la otra atrapa los anticuerpos. Las muestras de los pacientes (p. ej., sangre y orina) se recogen en la membrana, y la acción capilar tira de la proteína a través de la línea. Los antígenos se unen a la nanopartícula de oro conjugada con el anticuerpo, y el complejo fluye a través de la membrana. Cuando el complejo antígeno/AuNP–anticuerpo pasa por la tira, es inmovilizado por los anticuerpos de captura en la segunda línea y aparece una línea de color.

Actualmente, están siendo bastante utilizados los test rápidos de antígenos recogiendo la muestra de fluido nasal y bucal. En ambos casos, lo que se detecta son antígenos SARS-CoV-2 a través de un inmunoensayo cualitativo basado en membrana. El anticuerpo SARS-CoV-2 se recubre en la región de la línea de prueba. Durante la prueba, la muestra reacciona con partículas recubiertas de anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Luego, la mezcla

migra hacia arriba en la membrana por acción capilar y reacciona con el anticuerpo SARS-CoV-2 en la región de la línea de prueba. Si la muestra contiene antígenos del SARS-CoV-2, aparecerá una línea de color en la región de la línea de prueba como resultado de esto. Si la muestra no contiene antígenos del SARS-CoV-2, no aparecerá ninguna línea de color en la región de la línea de prueba, lo que indica un resultado negativo. Para que sirva como control de procedimiento, siempre aparecerá una línea de color en la región de la línea de control, lo que indica que se ha agregado el volumen adecuado de muestra y se ha producido la absorción de la membrana. En comparación con la prueba RT.PCR, ofrece una correlación superior al 97 %.

Otro ensayo, recoge el desarrollo de un test de detección rápida también basado en nanopartículas de oro (Au-NP) pero en lugar de detectar las proteínas del virus, en este caso detecta inmunoglobulinas M (Ig M) producidas por el cuerpo al reaccionar contra el virus. Demostró una sensibilidad y especificidad de 100 y 93,3 % respectivamente al compararlo con la PCR. Además, demostraron que no hay interferencia de otros virus durante el ensayo (Huang 2020).

4.2. PCR

El protocolo aprobado por la OMS para la detección del SARS-CoV-2 en muestras de mucosas de vías respiratorias humanas es conocido como «Protocolo Berlín», el cual se basa en la detección y cuantificación del virus mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) (Corman *et al.* 2020). El procedimiento comienza con la extracción del material genético del virus, eliminando las proteínas estructurales y recuperando secuencias específicas de ARN. Posteriormente, se promueve la transcripción inversa del ARN, para formar una molécula de ADN, seguido por la reacción en cadena de la proteína polimerasa que amplifica esta secuencia.

Además de este método, se han utilizado otros de amplificación de genes, pero sus principales limitaciones son la complejidad que presentan, que se requiere de personal especializado y de mucho tiempo. Para evitar estas limitaciones, Yang *et al.* (2020) desarrollaron un ensayo de transcripción inversa simplificada (RT-LAMP) para diagnosticar rápidamente el SARS-CoV-2. En 2003, este método fue utilizado con el coronavirus del SARS y fue considerado rápido y fácil. Desde entonces, se ha desarrollado un ensayo RT-LAMP NBS para diagnosticar de forma rápida y precisa la COVID-19 (Abdul *et al.* 2020). El ensayo NBS combina amplificación LAMP, transcripción inversa, y análisis múltiple con biosensores basados en nanopartículas para facilitar el diagnóstico de COVID-19 en un solo paso, esto es, en un solo tubo de reacción.

Los biosensores constituyen igualmente un método rápido que aprovecha las propiedades conductoras y semiconductoras de los nanomateriales para determinar la presencia y la concentración de material genético, proteínas o partículas virales en muestras complejas. Para el diagnóstico de SARS-CoV-2 se ha propuesto el uso de biosensores de transistor de efecto de campo (BioFET, por sus siglas en inglés), los cuales funcionan por el acoplamiento de un transistor con una biomolécula que sirve como receptor selectivo del analito, en una dinámica similar a la unión antígeno-anticuerpo (Jindal *et al.* 2020).

Debido a sus propiedades conductoras, las nanopartículas metálicas de oro y grafeno son ideales para la construcción de electrodos selectivos para componentes virales de SARS-CoV-2. Mahari *et al.* (2020), construyeron un electrodo para soportar nanopartículas esféricas de oro, las cuales fueron funcionalizadas con el antígeno de la proteína S1 de SARSCoV-2. El electrodo mostró una respuesta de 10 a 30 segundos, con un límite de detección de 90 a 120 fM en muestras de tampón fosfato y saliva, respectivamente. Hasta ahora, las pruebas de detección de antígenos y anticuerpos en saliva son escasos para SARS-CoV-2, la mayoría de estos estudios son limitados debido al bajo número de participantes, y a las diferentes etapas de la enfermedad en la que cada uno se encuentra, y en virtud de ello la carga viral es variable (Azzi *et al.* 2020; Mujawar *et al.* 2020).

Junto con los ensayos genéticos para la detección del SARS-CoV-2, existen pruebas serológicas que evalúan la aparición de los anticuerpos generados por las células linfocíticas en virtud de la exposición a los antígenos generados por las subunidades virales. En el caso del SARS-CoV-2 los anticuerpos son generados para los antígenos de las proteínas N y S (Long *et al.* 2020). Estos ensayos miden principalmente las inmunoglobulinas M y G, las cuales aparecen en diferentes estadios de la enfermedad y tras la recuperación del paciente, a través de ensayos inmunológicos (*e. g.* ELISA). Las pruebas serológicas son mucho menos precisas que las genéticas, especialmente porque las inmunoglobulinas comienzan a aparecer 7 días después del contagio; aunque este lapso puede variar en función de la severidad de la infección (fig. 5). En contraste, los métodos RT-PCR y RT-LAMP pueden medir el agente patógeno desde los primeros días de la infección y en muestras variadas, como mucosas, esputo o heces.

En la tabla 2 se exponen distintas técnicas de diagnóstico.

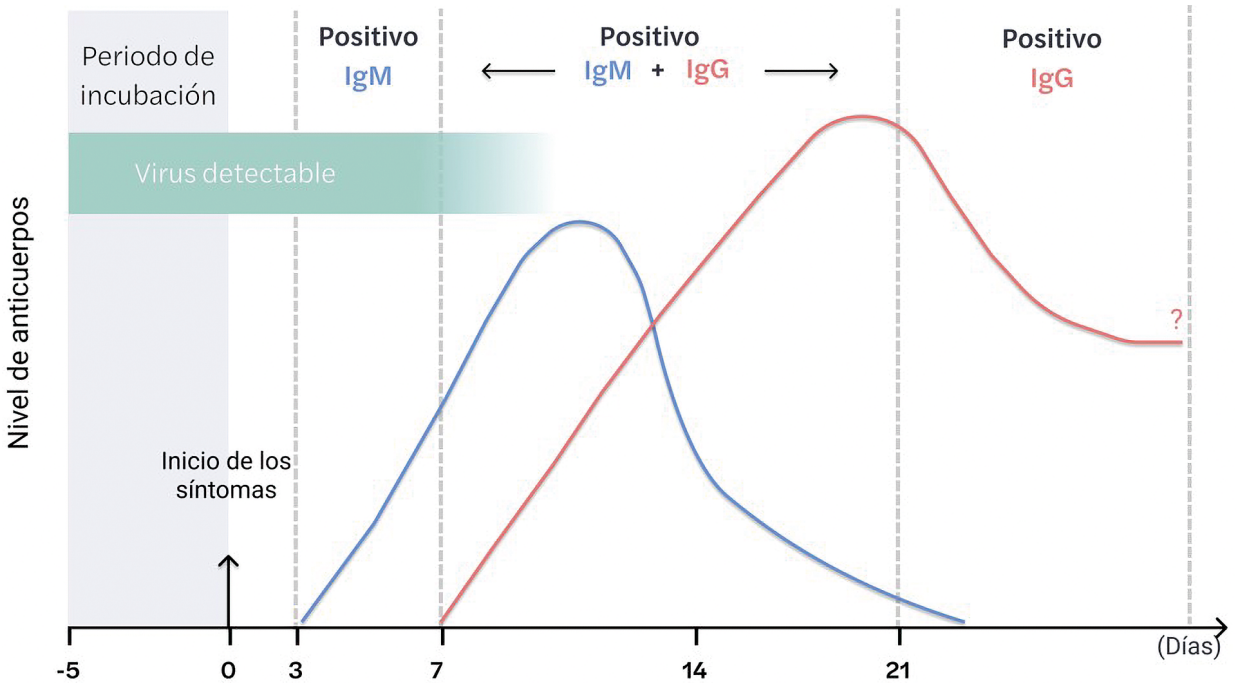


Figura 5. Evolución de los niveles de anticuerpos Ig M e Ig G en sangre respecto al tiempo

Tabla 2. Diferentes técnicas de diagnóstico. Modificado de (Tiwari *et al.* 2022)

Técnica detección	Principio de detección	Tiempo de detección	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Cultivo celular	Ensayo de infectividad	Días	Amplio espectro, barato	Cultivos celulares difíciles de mantener; propenso a contaminación	Hematian *et al.* 2016
Microscopio electrónico	Partícula viral	Horas	Amplio espectro, método rápido	Mínimo 10^6 partículas mL^{-1} requeridas para detección, propensa a morfologías cruzadas	Sridhar *et al.* 2015
Ensayo de hemaglutinación	Proteína viral	Horas	Fácil, barato	Se requieren reactivos frescos y menos sensibles	Soler 1998
ELISA	Proteína viral	Horas	Proceso de un solo paso, eficaz a altas concentraciones de analitos.	Se requiere una alta concentración de analitos, las respuestas de antígeno o anticuerpo producidas son indistinguible en un solo paso	Diel *et al.* 2016
PCR	Ácido nucleico viral	Horas	Sensibilidad extremadamente alta, fácil de configurar	Altamente propenso a la contaminación, difícil obtener resultados cuantitativos	Balasuriya *et al.* 2015

5. OTRAS APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS EN LA ÉPOCA COVID

5.1. Equipo de protección individual (EPI)

Se conoce que una de las principales razones de la propagación de la infección por COVID-19 es el contacto de persona a persona y las gotitas respiratorias de la persona infectada (Howard *et al.* 2021), por lo que tanto los profesionales de la salud, como todos en particular debemos protegernos de forma adecuada. Sin embargo, hay muchos problemas con respecto a la disponibilidad y la idoneidad de los productos de EPI, por ejemplo, mascarillas que no se ajustan correctamente o no son adecuadas para restringir partículas virales presentes en el aire, es por ello que se recomienda el uso de EPI adecuados, como mascarillas y guantes, y la nanotecnología ha contribuido

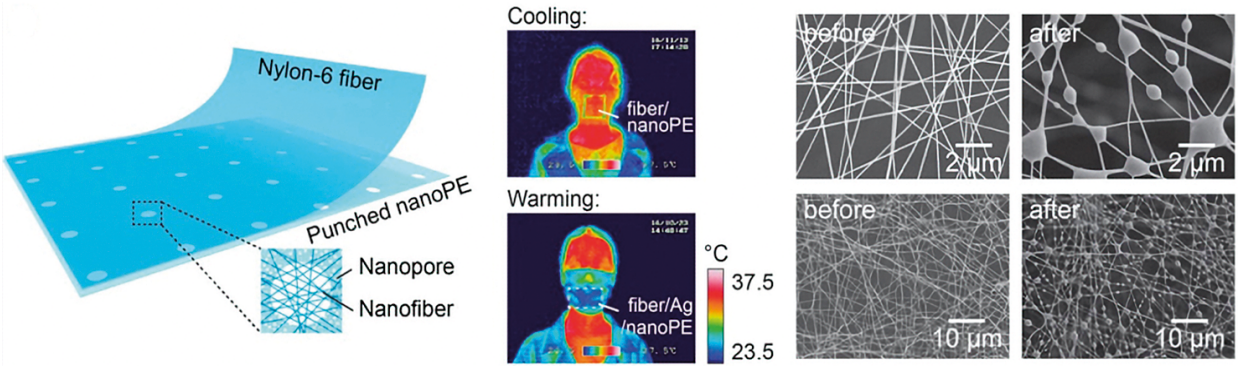


Figura 6. Empleo de nanofibras en la producción de mascarillas (Karmacharya *et al.* 2021)

de forma eficaz a ello, sobre todo en el diseño de mascarillas y respiradores (Karmacharya *et al.* 2021). Y es que la nanotecnología está ofreciendo nuevos materiales más cómodos, resistentes, y medios más seguros para la protección contra riesgos biológicos y químicos. Por ejemplo, nanomateriales que ofrecen hidrofobicidad y actividad antimicrobiana sin afectar a la textura o transpirabilidad del material (Campos *et al.* 2020).

En este sentido, la construcción de textiles hidrofóbicos incluye el uso de mil millones de fibras diminutas de hidrocarburos que son 3 veces más pequeñas que una fibra de algodón, lo que permite el aumento de la tensión superficial evitando la absorción de gotas. Otras metodologías incluyen superficies 3D a nanoescala, mediante la estructuración de materiales y/o el recubrimiento con nanopartículas hidrofóbicas (Mansi *et al.* 2019; Yetisen *et al.* 2016).

De manera similar, el uso de nanomateriales puede otorgar propiedades antimicrobianas a los textiles utilizados en la fabricación de los EPI, de modo que se previene el crecimiento de microorganismos en la ropa (El-Nahhal *et al.* 2020). Se ha comprobado que tejidos de algodón, poliéster, poliamida y tejidos a base de celulosa impregnados con nanopartículas de plata y de cobre cuentan con un elevado poder antimicrobiano (Clement 2008; Kanovsky 2016). Park *et al.* (2018) demostraron que nanopartículas de plata pueden inactivar el virus de la influenza debido a su interacción con la membrana del virus. Por otro lado, Fuzimore *et al.* (2015), describieron una tecnología basada en cobre monovalente compuesto y/o nanopartículas finas de yoduro para productos textiles antimicrobianos. Este sistema puede inactivar el virus de la gripe y tiene potencial contra diferentes virus, como el coronavirus humano o el SARS-CoV.

Este uso de nanomateriales para la elaboración de mascarillas cumple con una doble función. Primero, la protección de la mascarilla funciona como un filtro, además de como un agente microbicida, lo que se traduce en un bloqueo e inactivación de los patógenos. En segundo lugar, la gestión de este material después de que su uso se vuelve más seguro, ya que la mayor parte de los patógenos se destruye en contacto con el tejido.

Uno de los mejores ejemplos de cómo la nanotecnología puede mejorar la protección personal es la producción de mascarillas. Las mascarillas tradicionales tienen un espacio entre las fibras, con un promedio de 10 a 30 μm, que es inadecuado para evitar el contacto con el virus, y la reducción de este espacio entre las fibras causa una reducción de la respiración y aumento tanto de temperatura como de la presión, haciéndolas incómodas para el usuario (Ren *et al.* 2013) y provocando, incluso, daños en la piel debido al uso continuo de las mismas (Elston 2020). Por ejemplo, mascarillas N95/FFP2 solo pueden proteger contra partículas de 100 a 300 nm de tamaño (Herron *et al.* 2020). El uso de nanomateriales (ver fig. 6), como nanofibras, puede reducir la resistencia a la respiración y disminuir la presión para proporcionar comodidad de uso, pero al mismo tiempo proteger contra partículas pequeñas (< 50 nm) (Conlon 2014). De este modo, se consigue una protección mucho mejor que las mascarillas quirúrgicas tradicionales, que no ofrecen protección contra partículas de 10-80 nm de tamaño.

Así, científicos de la Universidad Tecnológica de Queensland, Australia, han diseñado una mascarilla facial a partir de nanofibras de celulosa que puede filtrar partículas de menos de 100 nm y es transpirable mediante un cartucho de filtro desechable. Otra compañía, ha desarrollado una mascarilla reutilizable que utiliza espuma de grafeno conductora microporosa, que atrapa los microbios y la conducción de la carga eléctrica mata a los microorganismos patógenos (Mokhtarzadeh *et al.* 2017).

Las patentes tecnológicas también dejan esta tecnología abierta para la producción de otros tipos de EPI, como delantales quirúrgicos, médicos y batas de laboratorio, protección para los pies y sábanas, que pueden ayudar a evitar la propagación de patógenos (Clement 2008; Kanovsky 2016). Para guantes, algunos productos, a base de nanopartículas de plata, están disponibles y se venden por sus propiedades antibacterianas. Sin

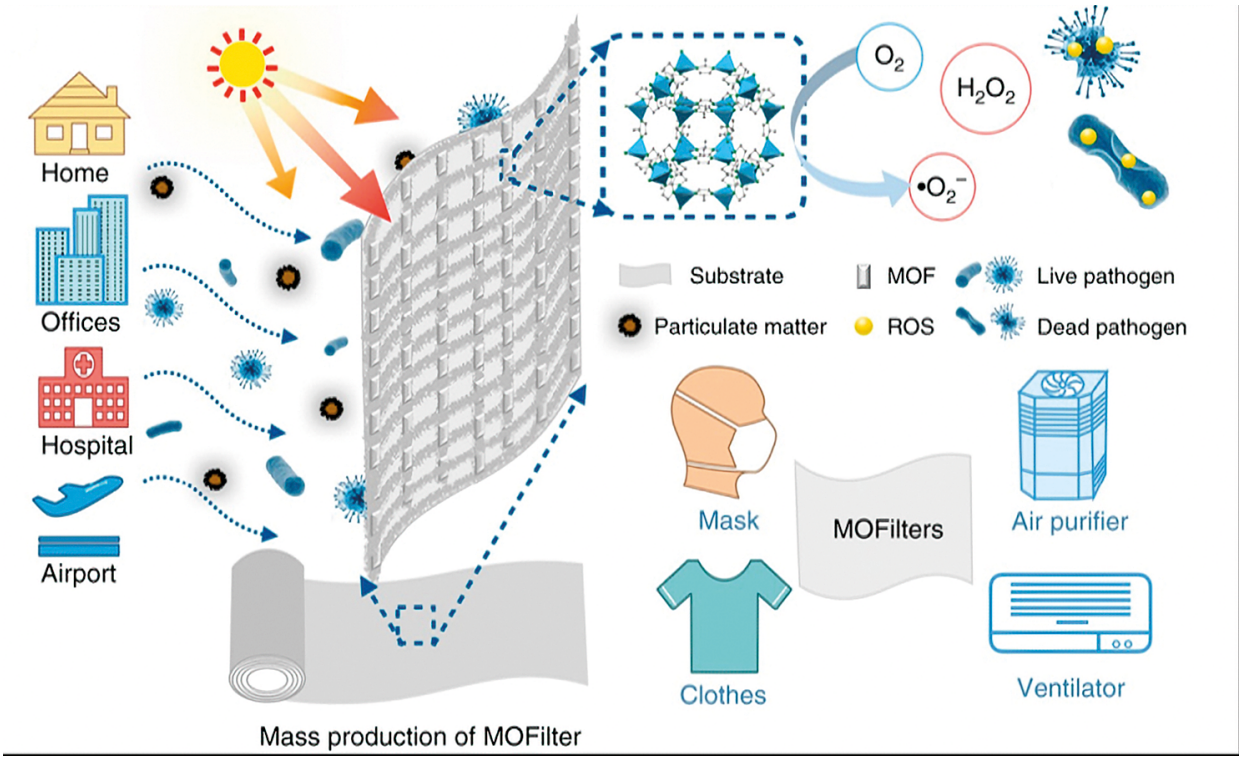


Figura 7. Representación esquemática de filtros para aplicaciones de limpieza de aire, ropa y mascarillas (Karmacharya *et al.* 2021)

embargo, el sistema también puede tener un potencial para protección contra virus, ya que los estudios han demostrado que las nanopartículas de plata también tienen actividad viricida (Deshmukh *et al.* 2019; Park *et al.* 2018; Jeevanandam *et al.* 2023).

Como hemos visto anteriormente, algunos nanomateriales tienen propiedades bactericidas al generar fotocatalíticamente radicales libres de oxígeno que matan microorganismos. Las NPs de óxido de titanio (TiO2) y óxido de zinc (ZnO) exhiben una filtración eficiente de partículas con eliminación bacteriana a través de sus actividades fotocatalíticas. Las mascarillas cuyas fibras de poliéster están recubiertas con NPs de ZnO reducen el 98 % de las bacterias dentro de 1 h de la incubación. Estas propiedades fotocatalíticas funcionan bien bajo abundante luz solar (fig. 7) (Karmacharya *et al.* 2021).

5.2. Superficies

Se sabe que el SARS-Cov-2 puede soportar condiciones ambientales adversas durante unas 72 h, que pueden contribuir a su rápida propagación. Por lo tanto, las estrategias de contención efectivas, como la desinfección, son críticos. La nanotecnología puede representar una alternativa para reducir la propagación del COVID-19, particularmente en áreas críticas, como centros de salud y lugares públicos (Durán Álvarez *et al.* 2020). Los productos basados en nanotecnología son eficaces para inhibir diferentes patógenos, incluidos los virus, independientemente de su perfil de resistencia a los medicamentos, estructura biológica o fisiología. Aunque hay varios productos antivirales basados en nanotecnología aprobados, cabe destacar el empleo de desinfectantes para la prevención de la propagación de SARS-Cov-2.

Múltiples nanomateriales pueden mostrar actividad antiviral, tanto de composición química orgánica como inorgánica (materiales metálicos) y su formulación activa es a menudo en forma de partículas libres en suspensión. Los nanomateriales antivirales suelen ser más pequeños que la mayoría de las partículas virales, como la partícula viral SARS-Cov-2, que tiene un tamaño promedio de 120 nm. Por lo tanto, los nanomateriales pueden interactuar con la partícula viral completa o con la superficie proteica y otros componentes estructurales, lo que conduce a la inactivación de los virus.

NanoTechSurface (Italia) ha desarrollado una solución desinfectante a base de iones de plata y dióxido de titanio para desinfectar superficies contaminadas con coronavirus. El desinfectante a base de nanopolímeros también muestra una actividad antimicrobiana efectiva, es fácil de desarrollar y es rentable, no inflamable y biodegradable. Soluciones a base de biopolímeros, se han utilizado también en la desinfección de vehículos en el transporte público (Dowd *et al.* 2020; Yu *et al.* 2020)

Por último, destacar que se está comprobando el papel de la inteligencia artificial (Mujawar *et al.* 2020)

en la minimización de la transmisión del virus. Son estudios aún recientes pero prometedores, así que en un futuro podremos comprobar el interés e importancia que presentan.

6. PROYECTOS FUTUROS

En la actualidad se están presentando numerosos proyectos para ayudar a entender el comportamiento del SARS-CoV-2, así se está investigando sobre el diseño de un nuevo dispositivo basado en nanotecnología biosensora óptica que permitirá detectar el coronavirus en unos 30 minutos, directamente a partir de la muestra del paciente y sin necesidad de realizar análisis en laboratorios clínicos. Además, se podrá usar para el análisis de diferentes tipos de coronavirus presentes en animales reservorios, de manera que se pueda monitorizar y vigilar una posible evolución de estos virus y prevenir futuros brotes infecciosos en humanos.

El Instituto de Investigación e Innovación Biomédica de Cádiz (INIBICA) trabaja basándose en la nanotecnología sobre la identificación de anticuerpos de inmunoglobulina (IgG) capaces de interrumpir la interacción del virus con su receptor celular gracias al uso de nanosensores. Estas proteínas IgG, que protegen al organismo tras sufrir una infección actuando como anticuerpos contra la enfermedad, son capaces de frenar la unión del virus con las células a las que infecta. Bajo un punto de vista parecido se realizan estudios sobre el uso de nanopartículas de carbono unidas a anticuerpos para detectar inmunoglobulinas IgG e IgM en test rápidos. El escalado industrial se considera sencillo y podría llegar a ser uno de los primeros test de nanocarbono (Aranda *et al.* 2020).

Se están realizando esfuerzos para desarrollar kits de diagnóstico más sensibles, específicos y fáciles de usar para detectar el virus. Igualmente se está investigando en la búsqueda de materiales que sean altamente protectores, así como en medios y métodos de descontaminación ambiental, y todo ello con la ayuda de la nanotecnología (Rashidzadeh *et al.* 2021).

En la lucha contra el COVID-19, la investigación, el desarrollo y la implementación de tecnología son nuestras mejores armas. La nanotecnología ofrece un conjunto único de herramientas y puede contribuir sustancialmente a nuestra comprensión de las enfermedades virales y hacia el desarrollo de plataformas diagnósticas y terapéuticas. Juntos, podemos superar esta pandemia actual para prevenir y mitigar futuros brotes virales.

CONCLUSIONES

Aunque la situación epidemiológica del coronavirus está al alza, al tiempo que evoluciona Ómicron, en especial con su subvariante BA2.1.2.1, con cerca de 140 mil nuevas infecciones diarias, sería conveniente combinar otras tecnologías con la nanotecnología para facilitar y promover su aplicación en los tratamientos de la COVID-19. Por ejemplo, la inteligencia artificial, que se ha explorado para el diagnóstico y la identificación de medicamentos que podrían reutilizarse para tratar esta enfermedad.

Con la profundización en el conocimiento del SARS-CoV-2 y los avances de investigación relacionados, esperamos y creemos que la nanotecnología puede ofrecer enfoques más oportunos y efectivos, sin mencionar otros virus emergentes en el futuro.

Por último, hay que comentar que se podrían aprovechar las propiedades únicas de los materiales tamaño nanométrico para detección y tratamiento del COVID-19, lo que sin duda contribuirá a proporcionar un alivio de la pandemia.

BIBLIOGRAFÍA

ABDUL, W., MUHAMMAD, A., ATTA ULLAH, K., ASMAT, A. & ABDUL, B. (2020), Role of Nanotechnology in Diagnosing and Treating COVID-19 during the Pandemic. International Journal of Clinical Virology 4(1): 065-070.

ALEMÁN, J., CHADWICK, A. V, HE, J., ..., MOAD, G., PENCZEK, S. & STEPTO, R. F. T. (2007), Definitions of Terms Relating to the Structure and Processing of Sols, Gels, Networks, and Inorganic-Organic Hybrid Materials (IUPAC Recommendations 2007). Pure and Applied Chemistry 79(10): 1801-1829.

ARANDA, P., WICKLEIN, B., RUIZ-GARCIA, C., ..., DARDER, M., DEL REAL, G. & RUIZ-HITZKY, E. (2020), Research and Patents on Coronavirus and COVID-19: A Review. Recent Patents on Nanotechnology 14(4): 328-350.

AZZI, L., CARCANO, G., GIANFAGNA, F., ..., ROSSI, A., TAGLIABUE, A. & BAJ, A. (2020), Saliva Is a Reliable Tool to Detect SARS-CoV-2. The Journal of Infection 81(1): e45-e50.

BALASURIYA, U. B. R., CROSSLEY, B. M. & TIMONEY, P. J. (2015), A Review of Traditional and Contemporary Assays for Direct and Indirect Detection of Equid Herpesvirus 1 in Clinical Samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 27(6): 673-687.

BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M. & WATKINS, J. C. (1965), Diffusion of Univalent Ions across the Lamellae of Swollen Phospholipids. Journal of Molecular Biology 13(1): 238-252.

BANIK, B. L., FATTAHI, P. & BROWN, J. L. (2016), Polymeric Nanoparticles: The Future of Nanomedicine. In Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 8(2): 271-299.

BAR-ON, Y. M., FLAMHOLZ, A., PHILLIPS, R. & MILO, R. (2020), SARS-CoV-2 (COVID-19) by the Numbers. eLife 9: e57309.

CAMPOS, E. V. R., PEREIRA, A. E. S., DE OLIVEIRA, J. L., CARVALHO, L. B., GUILGER-CASAGRANDE, M., DE LIMA, R. & FRACETO, L. F. (2020), How Can Nanotechnology Help to Combat COVID-19? Opportunities and Urgent Need. Journal of Nanobiotechnology 18(1): 125.

CHAUHAN, A. S. (2018), Dendrimers for Drug Delivery. Molecules 23: 938.

CHEN, M., ROSENBERG, J., CAI, X., ..., TIAN, B., MADARIAGA, M. L. & HUANG, J. (2021), Nanotraps for the Containment and Clearance of SARS-CoV-2. Materials 4(6): 2059-2082.

CLEMENT, S. (2008), Kupfer(II)enthaltende Formmasse aus Polyester, ihre Herstellung und Verwendung (Patent No. WO 00/0 53 413 A1). DE 10 2007 003 649 A1.

CONLON, M. (2014), A Facemask Having One or More Nanofiber Layers (Patent No. WO 2014/143039 A1).

CORMAN, V. M., LANDT, O., KAISER, M., ..., REUSKEN C., KOOPMANS, M.P.G. & DROSTEN, C. (2020), Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) by Real-Time RT-PCR. Eurosurveillance 25(3): 2000045.

CROISSANT, J. G., FATIEIEV, Y. & KHASHAB, N. M. (2017), Degradability and Clearance of Silicon, Organosilica, Silsesquioxane, Silica Mixed Oxide, and Mesoporous Silica Nanoparticles. Advanced Materials 29(9): 1604634.

CRUCHO, C. I. C. & TERESA, M. (2017), Polymeric Nanoparticles: A Study on the Preparation Variables and Characterization Methods. Materials Science & Engineering C 80: 771-784.

DE BARROS, A. O., DA S., PINTO, S. R., ..., MARICATO, J. T., ROSA, D. S. & SANTOS-OLIVEIRA, R. (2023), Polymeric Nanoparticles and Nanomicelles of Hydroxychloroquine Co-Loaded with Azithromycin Potentiate Anti-SARS-CoV-2 Effect. Journal of Nanostructure in Chemistry 13(2): 263-281.

DE WIT, E., VAN DOREMALEN, N., FALZARANO, D. & MUNSTER, V. J. (2016), SARS and MERS: Recent Insights into Emerging Coronaviruses. Nature Reviews Microbiology 14(8): 523-534.

DESHMUKH, S. P., PATIL, S. M., MULLANI, S. B. & DELEKAR, S. D. (2019), Silver Nanoparticles as an Effective Disinfectant: A Review. Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications 97: 954-965.

DIEL, D. G., LAWSON, S., OKDA, F., ..., FERNANDES, M. H. V, CHRISTOPHER-HENNINGS, J. & NELSON, E. A. (2016), Porcine Epidemic Diarrhea Virus: An Overview of Current Virological and Serological Diagnostic Methods. Virus Research 226: 60-70.

DOWD, K. O., NAIR, K. M., FOROUZANDEH, P., MATHEW, S., GRANT, J., MORAN, R., BARTLETT, J., BIRD, J. & PILLAI, S. C. (2020), O'Dowd-2020-Face Masks and Respirators in the Fight against the COVID-19 Pandemic: A Review of Current Materials, Advances and Future Perspectives. Materials 13(15): 3363.

DU, L., YANG, Y., ZHANG, X. & LI, F. (2022), Recent Advances in Nanotechnology-Based COVID-19 Vaccines and Therapeutic Antibodies. Nanoscale 14(4): 1054-1074.

DURÁN ÁLVAREZ, J. C., MARTÍNEZ AVELAR, C. & MEJÍA ALMAGUER, D. (2020), El papel de la nanociencia y la nanotecnología en el marco de la pandemia de COVID-19. Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencias y Nanotecnología, 14(27): 1e-29e.

EL-NAHHAL, I. M., SALEM, J., ANBAR, R., KODEH, F. S. & ELMANAMA, A. (2020), Preparation and Antimicrobial Activity of ZnO-NPs Coated Cotton/Starch and Their Functionalized ZnO-Ag/Cotton and Zn(II) Curcumin/Cotton Materials. Scientific Reports 10(1): 5410.

ELSTON, D. M. (2020), Occupational Skin Disease among Health Care Workers during the Coronavirus (COVID-19) Epidemic. Journal of the American Academy of Dermatology 82(5): 1085-1086.

EZER, N., BELGA, S., DANEMAN, N., ..., MARTIN, J. G., LEE, T. C. & MCDONALD, E. G. (2021), Inhaled and Intranasal Ciclesonide for the Treatment of COVID-19 in Adult Outpatients: CONTAIN Phase II Randomised Controlled Trial. BMJ 375: e068060.

FLORINDO, H. F., KLEINER, R., VASKOVICH-KOUBI, D., ..., TIRAM, G., LIUBOMIRSKI, Y. & SATCHI-FAINARO, R. (2020), Immune-Mediated Approaches against COVID-19. Nature Nanotechnology 15(8): 630-645.

FUZIMORE, Y. (2015), Virus Inactivating Cloth (Patent No. WO 2011/040048). RU 2 550 922 C2.

GOWRI, A., ASHWIN KUMAR, N. & SURESH ANAND, B. S. (2021), Recent Advances in Nanomaterials Based Biosensors for Point of Care (PoC) Diagnosis of COVID-19 – A Minireview. TrAC Trends in Analytical Chemistry 137: 116205.

HEMATIAN, A., SADEGHIFARD, N., MOHEBI, R., TAHERIKALANI, M., NASROLAHI, A., AMRAEI, M. & GHAFOURIAN, S. (2016), Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. Osong Public Health and Research Perspectives 7(2): 77-82.

HERRON, J. B. T., HAY-DAVID, A. G. C., GILLIAM, A. D. & BRENNAN, P. A. (2020), Personal Protective Equipment and COVID-19 – A Risk to Healthcare Staff? In The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 58(5): 500-502.

HOWARD, J., HUANG, A., LI, Z., ..., CHU, L. F., RAMIREZ, C. M. & RIMOIN, A. W. (2021), An Evidence Review of Face Masks against COVID-19. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 118(4): 1-12.

HUANG, C., WANG, Y., LI, X., REN, L., ZHAO, J., HU, Y. & ZHANG, L. (2020), Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China. The Lancet 395: 497-506.

JAFARI, A., DANESH POUYA, F., NIKNAM, Z., ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH, M., REZAEI-TAVIRANI, M. & RASMI, Y. (2022), Current Advances and Challenges in COVID-19 Vaccine Development: From Conventional Vaccines to Next-Generation Vaccine Platforms. Molecular Biology Reports 49(6): 4943-4957.

JEEVANANDAM, J., RODRIGUES, J., PAN, S. & DANQUAH, M.K. (2023), Chapter 8 – Cellulose-Based Bionanocomposites: Synthesis, Properties, and Applications. In *Advances in Bionanocomposites*, pp. 191-210.

JIANG, S., HE, Y. & LIU, S. (2005), SARS Vaccine Development. Emerging Infectious Diseases 11(7): 1016-1020.

JINDAL, S. & GOPINATH, P. (2020), Nanotechnology Based Approaches for Combatting COVID-19 Viral Infection. Nano Express 1(2): 022003.

KANOVSKY, M. (2016), Antimicrobial Fabric Materials for Use in Safety Masks and Personal Protection Clothing (Patent No. WO 2016/125173 A1).

KARMACHARYA, M., KUMAR, S., GULENKO, O. & CHO, Y.-K. (2021), Advances in Facemasks during the COVID-19 Pandemic Era. ACS Applied BioMaterials 4(5): 3891-3908.

KHAILANY, R. A., SAFDAR, M. & OZASLAN, M. (2020), Genomic Characterization of a Novel SARS-CoV-2. Gene Reports 19: 100682.

KHURANA, A., ALLAWADHI, P., KHURANA, I., ..., CHHABRA, D., JOSHI, K. & BHARANI, K. K. (2021), Role of Nanotechnology behind the Success of mRNA Vaccines for COVID-19. Nano Today 38: 101142.

KIM, B. Y. S., RUTKA, J. T. & CHAN, W. C. W. (2010), Nanomedicine. New England Journal of Medicine 363(25): 2434-2443.

KYEONG, S., KIM, J., CHANG, H., ..., RHO, W.-Y., PHAM, X.-H. & JUN, B.-H. (2021), Magnetic Nanoparticles. Advances in Experimental Medicine and Biology 1309: 191-215.

LÉRIDA-VISO, A., ESTEPA-FERNANDEZ, A., GARCÍA-FERNANDEZ, A., MARTÍ-CENTELLES, V. & MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. (2023), Biosafety of Mesoporous Silica Nanoparticles; towards Clinical Translation. Advanced Drug Delivery Reviews 201: 115049.

LETCHFORD, K., LIGGINS, R., WASAN, K. M. & BURT, H. (2009), In Vitro Human Plasma Distribution of Nanoparticulate Paclitaxel Is Dependent on the Physicochemical Properties of Poly (Ethylene Glycol) – Block-Poly (Caprolactone) Nanoparticles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 71(2): 196-206.

LI, M., DU, C., GUO, N., ..., LI, S., YU, P. & GALONS, H. (2019), Composition Design and Medical Application of Liposomes. European Journal of Medicinal Chemistry 164: 640-653.

LI, S., JI, Z., ZOU, M., NIE, X., SHI, Y. & CHENG, G. (2011), Preparation, Characterization, Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Tetrandrine. AAPS PharmSciTech 12(3): 2-9.

LIMA, T. L. C., FEITOSA, R. DE C., DOS SANTOS-SILVA, E., ..., FERNANDES-PEDROSA, M. DE F., FARIAS, K. J. S. & DA SILVA-JÚNIOR, A. A. (2018), Improving Encapsulation of Hydrophilic Chloroquine Diphosphate into Biodegradable Nanoparticles: A Promising Approach against Herpes Virus Simplex-1 Infection. Pharmaceutics 10(4): 1-18.

LONG, Q.-X., LIU, B.-Z., DENG, H.-J., ..., HU, J.L., CHEN, J. & HUANG, A.-L. (2020), Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with COVID-19. Nature Medicine 26(6): 845-848.

LOPEZ-CANTU, D. O., WANG, X., CARRASCO-MAGALLANES, H., AFEWERKI, S., ZHANG, X., BONVENTRE, J. V. & RUIZ-ESPARZA, G. U. (2022), From Bench to the Clinic: The Path to Translation of Nanotechnology-Enabled mRNA SARS-CoV-2 Vaccines. Nano-Micro Letters 14 (1): 41.

MAHARI, S., ROBERTS, A., SHAHDEO, D. & GANDHI, S. (2020), eCovSens-Ultrasensitive Novel In-House Built Printed Circuit Board Based Electrochemical Device for Rapid Detection of nCOVID-19 Antigen, A Spike Protein Domain 1 of SARS-CoV-2. BioRxiv; https://doi.org/10.1101/2020.04.24.059204

MALLAKPOUR, S., AZADI, E. & HUSSAIN, C. M. (2021), The Latest Strategies in the Fight against the COVID-19 Pandemic: The Role of Metal and Metal Oxide Nanoparticles. New Journal of Chemistry 45(14): 6167-6179.

MANSI, A., BOCCUNI, F. & IAVICOLI, S. (2019), Nanomaterials as a New Opportunity for Protecting Workers from Biological Risk. Industrial Health 57(6): 668-675.

MATEA, C. T., MOCAN, T., TABARAN, F., POP, T., MOSTEANU, O., PUIA, C., IANCU, C. & MOCAN, L. (2017), Quantum Dots in Imaging, Drug Delivery and Sensor Applications. International Journal of Nanomedicine 12: 5421-5431.

MENDONÇA, M.C.P., KONT, A., KOWALSKI, P.S. & O'DRISCOLL, C.M. (2023), Design of Lipid-Based

Nanoparticles for Delivery of Therapeutic Nucleic Acids. Drug Discovery Today 28 (3): 1-17.

MISHRA, A., KUMAR, r., MISHRA, J., ..., BISHI D.K., GUPTA, P.K. & NAYAK, S. (2023), Strategies Facilitating the Permeation of Nanoparticles through Blood-Brain Barrier: An Insight towards the Development of Brain-Targeted Drug Delivery System. Journal of Drug Delivery Science and Technology 86: 104694.

MITCHELL, M. J., BILLINGSLEY, M. M., HALEY, R. M., LANGER, R., WECHSLER, M. E. & PEPPAS, N. A. (2021), Engineering Precision Nanoparticles. Nature Reviews Drug Discovery 20: 101-124.

MOKHTARZADEH, A., EIVAZZADEH-KEIHAN, R., PASHAZADEH, P., ..., HASANZADEH, M., BARADARAN, B. & DE LA GUARDIA, M. (2017), Nanomaterial-Based Biosensors for Detection of Pathogenic Virus. Trends in Analytical Chemistry 97: 445-457.

MONTES-GARCÍA, V., SQUILLACI, M. A., DIEZ-CASTELLNOU, M., ONG, Q. K., STELLACCI, F. & SAMORÌ, P. (2021), Chemical Sensing with Au and Ag Nanoparticles. Chemical Society Reviews 50(2): 1269-1304.

MUJAWAR, M. A., GOHEL, H., BHARDWAJ, S. K., SRINIVASAN, S., HICKMAN, N. & KAUSHIK, A. (2020), Nano-Enabled Biosensing Systems for Intelligent Healthcare: Towards COVID-19 Management. Materials Today Chemistry 17: 100306.

NAJAHI-MISSAOUI, W., ARNOLD, R. D. & CUMMINGS, B. S. (2021), Safe Nanoparticles: Are We There Yet? International Journal of Molecular Sciences 22(1): 1-22.

NEAMTU, I., RUSU, A. G., DIACONU, A., NITA, L. E. & CHIRIAC, A. P. (2017), Basic Concepts and Recent Advances in Nanogels as Carriers for Medical Applications. Drug Delivery 24(1): 539-557.

ORTEGA, E., RUIZ, M. A., PERALTA, S., RUSSO, G. & MORALES, M. E. (2020), Improvement of Mesoporous Silica Nanoparticles: A New Approach in the Administration of NSAIDS. Journal of Drug Delivery Science and Technology 58: 1-8.

PALESTINO, G., GARCÍA-SILVA, I., GONZÁLEZ-ORTEGA, O. & ROSALES-MENDOZA, S. (2020), Can Nanotechnology Help in the Fight against COVID-19? Expert Review of Anti-Infective Therapy 18(9): 849-864.

PARK, S., KO, Y.-S., LEE, S. J., LEE, C., WOO, K. & KO, G. (2018), Inactivation of Influenza A Virus via Exposure to Silver Nanoparticle-Decorated Silica Hybrid Composites. Environmental Science and Pollution Research International 25(27): 27021-27030.

PAULL, J. R. A., LUSCOMBE, C. A., CASTELLARNAU, A., HEERY, G. P., BOBARDT, M. D. & GALLAY, P. A. (2021), Protective Effects of Astodrimer Sodium 1% Nasal Spray Formulation against SARS-CoV-2 Nasal Challenge in K18-hACE2 Mice. Viruses 13(8): 1656.

PEPLOW, M. (2021), Nanotechnology Offers Alternative Ways to Fight COVID-19 Pandemic with Antivirals. Nature Biotechnology 39(10): 1172-1174.

PINAZO-HERNANDIS, S. (2020), Psychosocial Impact of COVID-19 on Older People: Problems and Challenges. Revista Española de Geriatría y Gerontología 55(5): 249-252.

PRAMANIK, A., GAO, Y., PATIBANDLA, S., ..., GATES, K., TANDON, R. & CHANDRA RAY, P. (2021), The Rapid Diagnosis and Effective Inhibition of Coronavirus Using Spike Antibody Attached Gold Nanoparticles. Nanoscale Advances 3(6): 1588-1596.

RAI, M., BONDE, S., YADAV, A., BHOWMIK, A., RATHOD, S., INGLE, P. & GADE, A. (2021), Nanotechnology as a Shield against COVID-19: Current Advancement and Limitations. Viruses 13(7): 1224.

RAMAIAH, G. B., TEGEGNE, A. & MELESE, B. (2021), Functionality of Nanomaterials and Its Technological Aspects – Used in Preventing, Diagnosing and Treating COVID-19. Materials Today: Proceedings 47: 2337-2344.

RASHIDZADEH, H., DANAFAR, H., RAHIMI, H., ..., EFTEKHARI, A., NOSRATI, H. & MIRSAEIDI, M. (2021), Nanotechnology against the Novel Coronavirus (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2): Diagnosis, Treatment, Therapy and Future Perspectives. Nanomedicine 16(6): 497-516.

REICHMUTH, A. M., OBERLI, M. A., JAKLENEC, A., LANGER, R. & BLANKSCHTEIN, D. (2016), mRNA Vaccine Delivery Using Lipid Nanoparticles, Therapeutic Delivery 7(5): 319-334.

REN, G., OXFORD, J. S., LAMBKIN-WILLIAMS, P. & MANN, A. (2013), Anti-Viral Formulations Nanomaterials and Nanoparticles (Patent No. US 2013/009 1611 A1).

RODE, A., SHARMA, S. & MISHRA, D. K. (2018), Carbon Nanotubes: Classification, Method of Preparation and Pharmaceutical Application. Current Drug Delivery 15(5): 620-629.

SHARMA, A., GARG, T., AMAN, A., PANCHAL, K., SHARMA, R., KUMAR, S. & MARKANDEYWAR, T. (2016), Nanogel – An Advanced Drug Delivery Tool: Current and Future. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology 44(1): 165-177.

SINGH, P., SINGH, D., SA, P., MOHAPATRA, P., KHUNTIA, A. & SAHOO, S. K. (2021), Insights from Nanotechnology in COVID-19: Prevention, Detection, Therapy and Immunomodulation. Nanomedicine 16(14): 1219-1235.

SINGH, Y., MEHER, J. G., RAVAL, K., KHAN, F. A., CHAURASIA, M., JAIN, N. K. & CHOURASIA, M. K.

(2017), Nanoemulsion: Concepts, Development and Applications in Drug Delivery. Journal of Controlled Release 252: 28-49.

SOLER, M. (1998), Laboratory Diagnosis to Dengue Virus Infections. Acta científica venezolana 49 Suppl 1: 25-32.

SOUTO, E. B. & DOKTOROVOVÁ, S. (2009), Solid Lipid Nanoparticle Formulations. Pharmacokinetic and Biopharmaceutical Aspects in Drug Delivery. In *Methods in Enzymology* (Vol. 464, Issue C, pp. 105-129).

SRIDHAR, S., TO, K. K. W., CHAN, J. F. W., LAU, S. K. P., WOO, P. C. Y. & YUEN, K.-Y. (2015), A Systematic Approach to Novel Virus Discovery in Emerging Infectious Disease Outbreaks. The Journal of Molecular Diagnostics 17(3): 230-241.

TANG, Z., ZHANG, X., SHU, Y., GUO, M., ZHANG, H. & TAO, W. (2021), Insights from Nanotechnology in COVID-19 Treatment. Nano Today 36: 101019.

TIWARI, A. K., MISHRA, A., PANDEY, G., GUPTA, M. K. & PANDEY, P. C. (2022), Nanotechnology: A Potential Weapon to Fight against COVID-19. Particle and Particle Systems Characterization 39(1): 1-26.

TYAGI, P. K., TYAGI, S., KUMAR, A., AHUJA, A. & GOLA, D. (2021), Contribution of Nanotechnology in the Fight against COVID-19. Biointerface Research in Applied Chemistry, 11(1): 8233-8241.

VAHEDIFARD, F. & CHAKRAVARTHY, K. (2021), Nanomedicine for COVID-19: The Role of Nanotechnology in the Treatment and Diagnosis of COVID-19. Emergent Materials, 4(1): 75-99.

WHO (2020), Intervención del Director General de la OMS en la conferencia de prensa sobre el 2019-nCoV. *Organización Mundial de La Salud*. https://www.who.int/es/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020

YANG, W., DANG, X., WANG, Q., ..., WANG, M., PEI, F. & WAN, Y. (2020), Rapid Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription RT-LAMP method. MedRxiv, 2020.03.02.20030130.

YETISEN, A. K., QU, H., MANBACHI, A., ..., SKOROBOGATIY, M., KHADEMHOSSEINI, A. & YUN, S. H. (2016), Nanotechnology in Textiles. ACS Nano 10(3): 3042-3068.

YETISGIN, A. A., CETINEL, S., ZUVIN, M., KOSAR, A. & OZLEM, K. (2020), Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. Molecules 25(2193): 1-31.

YU, Y., BU, F., ZHOU, H., WANG, Y., CUI, J., WANG, X., NIE, G. & XIAO, H. (2020), Biosafety Materials: An Emerging New Research Direction of Materials Science from the COVID-19 Outbreak. Materials Chemistry Frontiers 4(7): 1930-1953.

ZARUBOVA, J., ZHANG, X., HOFFMAN, T., HASANI-SADRABADI, M. M. & LI, S. (2021), Biomaterial-based Immunoengineering to Fight COVID-19 and Infectious Diseases. Materials 4(5): 1528-1554.

ZHONGMIN, L. & TAO, W. (2021), *Prevention and Protection Handbook Against COVID-19*, SCPG Publishing Co.

Capítulo XXV

Vacunas basadas en partículas similares a virus y su papel en la pandemia de la COVID-19

Patrícia Piçarra[1] y Olga Borges[1, 2]

[1] *Faculty of Pharmacy, University of Coimbra.* [2] *Center for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra*

A finales de 2019, se identificó en China un nuevo coronavirus con la aparición de una neumonía atípica. La humanidad se puso rápidamente en alerta debido a la gran velocidad con la que este virus se estaba transmitiendo por todas partes. Este nuevo brote fue muy pronto declarado pandemia. Desde el primer momento surgió la necesidad de crear una vacuna capaz de poner fin a la pesadilla sobrevenida. Se probaron varias plataformas para el desarrollo de vacunas contra el síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2), entre ellas las vacunas basadas en partículas similares a virus (VLP). Las VLP, con algunos ejemplos ya en el mercado como las vacunas contra la hepatitis B y contra el virus del papiloma humano, son nanopartículas a base de proteínas que imitan la conformación del virus, presentando epítopos en su superficie. Ya se ha demostrado que las vacunas basadas en VLP tienen numerosas ventajas, incluido el hecho de que son seguras, no contienen material genético viral y son muy eficaces en términos de activación del sistema inmunológico. En la formulación de estas vacunas suelen aparecer asociadas sustancias adyuvantes.

El conocimiento de la estructura del SARS-CoV-2 ha hecho posible el desarrollo de partículas que imitan a este coronavirus. En el momento de la redacción de este texto, cinco vacunas VLP contra el SARS-CoV-2 se encuentran al menos en ensayos clínicos y muestran potencial para tener éxito. En este capítulo se reconoce el potencial de estas partículas que imitan a los virus, y cómo activan nuestro sistema inmunológico, y desentrañaremos los avances que están teniendo las vacunas basadas en VLP en esta lucha que enfrenta el mundo con la COVID-19. Naturalmente, para ello tenemos que descubrir cómo funciona este virus mortal.

INTRODUCCIÓN

A finales de 2019, en Wuhan, China, se identificaron varios casos de una neumonía viral atípica. Se observó que el agente etiológico responsable es un virus que pertenece a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* y género *Betacoronavirus*. El Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (ICTV) nombró al virus SARS-CoV-2 y a la enfermedad causada por el virus como la COVID-19 (Shereen *et al.* 2020). A nivel mundial, al 21 de junio de 2021, se habían producido 46 840 783 casos confirmados de COVID-19, incluidas 3 865 738 muertes (OMS 2021). No era la primera vez que esta familia *Coronaviridae* alarmaba a la comunidad científica y a todo el mundo. Antes, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) (2002) y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (2012) habían infectado a miles de personas, provocando síntomas de neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y, a veces, insuficiencia renal, y lamentablemente, muchas muertes. Sin embargo, nada comparado con los daños que el nuevo betacoronavirus estaba causando a nivel mundial (Shanmugaraj *et al.* 2020).

Todos los primeros casos de SARS-CoV-2 tienen alguna conexión con el mercado de mariscos en Wuhan, lo que estaba en línea con la teoría de que el nuevo virus provenía de una fuente zoonótica. Debido a la similitud entre SARS-CoV-2 y SARS-CoV, se estableció que lo más probable sería que el cruce de especies se produjera

a partir de un murciélago. Sin embargo, se piensa que debe haber existido un intermediario entre los murciélagos y los humanos, ya que el dominio de unión al receptor es significativamente diferente entre estas dos especies. No obstante, se desconoce que especie fue la intermediaria (Konda *et al.* 2020). El virus es altamente infeccioso y la causa del brote fue la transmisión de animal a humano. El SARS-CoV-2 se extendió rápidamente por todo el mundo, por lo que la COVID-19 fue caracterizado como pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2021), en marzo de 2020.

La principal vía de transmisión es la respiratoria y puede ocurrir de dos maneras: a) contacto con viriones suspendidos en gotitas, o b) contacto con aerosoles de una persona infectada (Santarpia *et al.* 2020; Lednicky *et al.* 2020). Es importante considerar que las condiciones ambientales son sumamente relevantes, ya que los espacios cerrados o los espacios abiertos tendrán mayores o menores tasas de transmisión, respectivamente. Además, también influye la distancia a la persona contagiada, por lo que a menor distancia mayor será la probabilidad de transmisión del virus; esto se debe a que los aerosoles y las gotas se esparcen principalmente en una distancia corta (Hu *et al.* 2021; Meyerowitz *et al.* 2021).

Otro modo de transmisión estudiado fue a través de fómites. Sin embargo, este método de transmisión no genera mucho acuerdo en la literatura. Hay autores que sostienen que los fómites infectados son relevantes para la propagación de la enfermedad, pues sostienen que los virus pueden permanecer viables durante días en las superficies gracias a la resistencia ambiental del SARS-CoV-2, considerando, sin embargo, que el tiempo en el que la viabililidad se mantiene, varía de una superficie a otra (Trends 2020; Pastorino *et al.* 2020). Otros autores, al contrario, no consideran especialmente relevante la transmisión del SARS-CoV-2 a través de fómites, ya que argumentan que los niveles de ARN viral encontrados en las superficies son demasiado bajos como para provocar una infección (Meyerowitz *et al.* 2021).

La transmisión vertical es otra posibilidad. La verdad es que faltan pruebas que respalden la transmisión de madre a feto. Se han notificado casos de bebés nacidos de madres con COVID-19 con una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) positiva tras el nacimiento (Alzamora *et al.* 2020). Pero también se han reportado muchos casos de madres infectadas que dieron a luz a bebés que no padecían la enfermedad, lo que hace creer que este tipo de transmisión es improbable (Li *et al.* 2020). Además, hay que considerar que incluso si no hay transmisión horizontal, una infección parental por SARS-CoV-2 puede tener efectos nocivos para el feto, como, por ejemplo, un mayor riesgo de parto prematuro, estrés fetal, trombocitopenia, alteración de la función hepática normal y, en el peor de los casos, incluso la muerte (Zu *et al.* 2020).

El receptor a través del cual el SARS-CoV-2 ingresa a las células se expresa en abundancia en el tracto gastrointestinal, por lo que naturalmente se puso sobre la mesa la hipótesis de que la vía de transmisión fecal-oral podría tener un impacto significativo en la propagación del virus. Lo cierto es que el material genético del SARS-CoV-2 se encontró en muestras de heces y biopsias de colon (Cuicchi *et al.* 2021). De hecho, existen informes de pacientes con COVID-19 en los que las muestras nasofaríngeas son negativas mientras que las rectales no (Hindson 2020; Zhang *et al.* 2020), aunque todavía existe mucha controversia sobre esta vía de transmisión. Ya existe literatura que muestra que además del ácido ribonucleico (ARN) existe la liberación de virus vivos a través de las heces de pacientes infectados, lo que implica que el SARS-CoV-2 podría potencialmente transmitirse por esta vía (Wang *et al.* 2020). Con respecto a la transmisión sexual y la transmisión sanguínea, hasta el momento los datos son que no existe transmisión a través de estos métodos (Meyerowitz *et al.* 2021).

Hay muchas medidas que deberíamos utilizar para disminuir la probabilidad de contagiarnos, o de contagiar a otros, entre las que destacan usar mascarilla y cambiarla cuando sea necesario, desinfectar superficies, respetar las distancias, o aislarnos en cuanto tengamos algún síntoma, entre otros. Tras el primer contacto con el virus, el período de incubación suele ser de 3 a 6 días, pero puede llegar hasta los 14 días. Los síntomas más comunes de la COVID-19 son fiebre, tos no productiva, mialgias, disnea y fatiga, pero también es posible que surjan trastornos gastrointestinales. En situaciones clínicas más complicadas, los pacientes acaban desarrollando neumonía, insuficiencia renal e incluso la muerte (Chakraborty *et al.* 2020). En una situación de pandemia la mejor opción es la vacunación. La necesidad de crear rápidamente una vacuna surgió poco después de que este virus comenzara a manifestarse. Desde el principio, toda la comunidad científica inició el estudio de la estructura del SARS-CoV-2, porque solo así sería posible alcanzar el objetivo de vacunación.

1. EL VIRUS Y SU ESTRUCTURA

Las similitudes estructurales entre el SARS-CoV-2 y los otros coronavirus, especialmente el SARS-CoV, son enormes, pero existen algunas peculiaridades entre ellos. El SARS-CoV-2, como los demás coronavirus, es un virus envuelto, un ARN monocatenario de sentido positivo (+ssRNA) con un genoma de entre 26-32 kilobases, lo que se considera un tamaño muy grande para el genoma de un virus (Li *et al.* 2020). El virus SARS-CoV-2

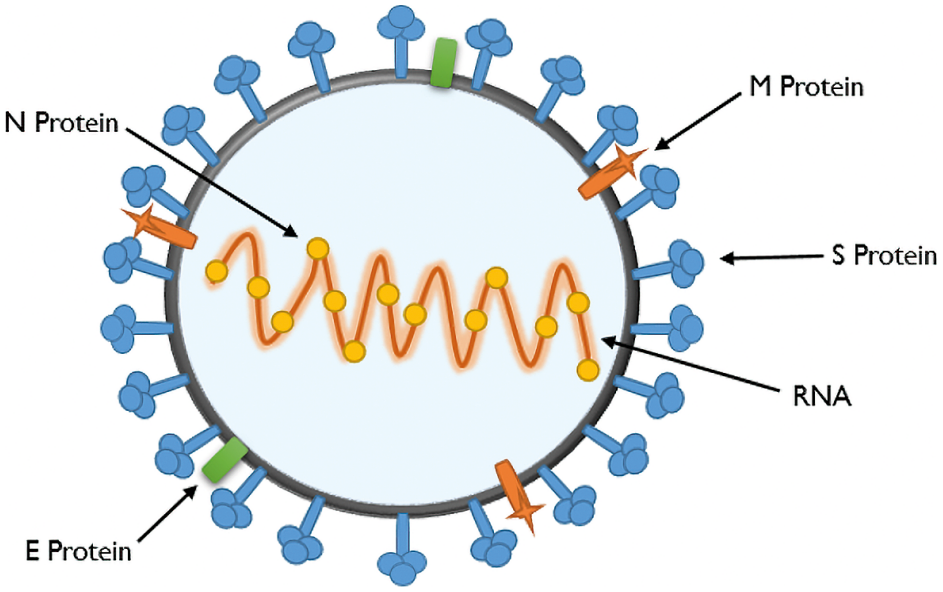


Figura 1. Estructura del SARS-CoV-2. El SARS-CoV-2 es un virus envuelto y su estructura viral está formada por cuatro proteínas estructurales: proteína S, M, E y N. La proteína N interactúa con el +ssRNA viral para formar la nucleocápside (Imagen propia)

presenta en su estructura cuatro proteínas estructurales: proteína de membrana (proteína M), proteína de espiga (proteína S), proteína de envoltura (proteína E) y proteína de la nucleocápside (proteína N), como podemos ver en la figura 1. También cuenta con 16 proteínas no estructurales que están asociadas a la maquinaria de replicación, y con casi una docena de proteínas accesorias.

El virus tiene que entrar en las células para poder reproducirse y causar enfermedades. La proteína S tiene el dominio de unión al receptor que media la unión a la célula huésped (Harrison *et al.* 2020). Dado que el estado abierto de la proteína S participa en la unión, la fusión y, en consecuencia, la entrada del virus en la célula huésped, ha sido y sigue siendo objeto de muchas investigaciones. Por ello, es el objetivo terapéutico más evidente. La proteína S está compuesta por dos dominios distintos con diferentes funciones, como podemos ver en la figura 2. La subunidad S1 comprende el dominio de unión al receptor, es decir, es la porción que se encargará de la unión al receptor de la célula huésped, que en el caso del SARS-CoV-2 es el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2), de forma similar a lo que ocurre con el SARS-CoV. Luego, la subunidad S2 con los péptidos de fusión (HR1 y HR2) media en la fusión del coronavirus con la célula huésped. Sin embargo, es necesario que se produzca una escisión proteolítica entre el sitio S1/S2, y en la subunidad S2, que sufre un cambio conformacional, para que se produzca la fusión de las membranas (Wang *et al.* 2020; Pomplun 2021).

En la literatura se describen diversos mecanismos mediante los cuales se produce la escisión proteolítica de la proteína S. Los principales mecanismos por los que se produce la entrada celular se muestran en la figura 3.

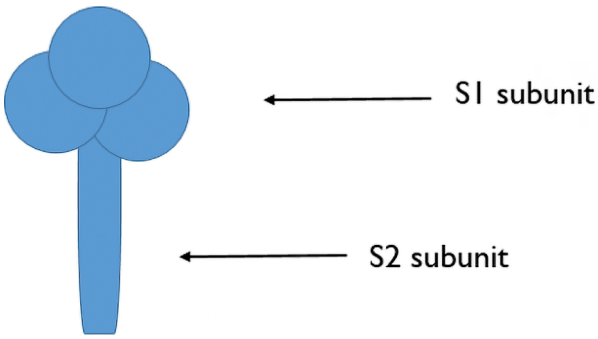


Figura 2. Estructura de la proteína S. El SARS-CoV-2 ingresa a la célula a través de la proteína S en la superficie del virus mediante la unión con el receptor ACE-2. La proteína S está compuesta por dos subunidades, S1 (que contiene el dominio de unión al receptor) y S2, que participan activamente, en la unión y fusión, respectivamente, del virus a la célula (Imagen propia)

Además de estos mecanismos que también se habían estudiado para el SARS-CoV, se consideró un nuevo mecanismo para el SARS-CoV-2, un sitio de escisión de furina único en S1/S2. La escisión la realizan las enzimas similares a la furina del huésped. Ya existen datos que sugieren que, en ausencia de este sitio, la capacidad replicativa del virus se reduce (Johnson *et al.* 2020). El sitio de escisión de furina tiene la capacidad de aumentar la afinidad de la proteína S por el receptor y, en consecuencia, mejorar la entrada del virus a la célula (Kadam *et al.* 2021). Los niveles de furina son más altos en diabéticos, personas obesas, personas mayores y también son más altos en hombres que en mujeres. Esto puede ser una explicación del aumento de las manifestaciones de la enfermedad en estas poblaciones (Abdelmassih *et al.* 2020).

La inmunización masiva, a través de la vacunación, es una de las intervenciones más importantes en el campo

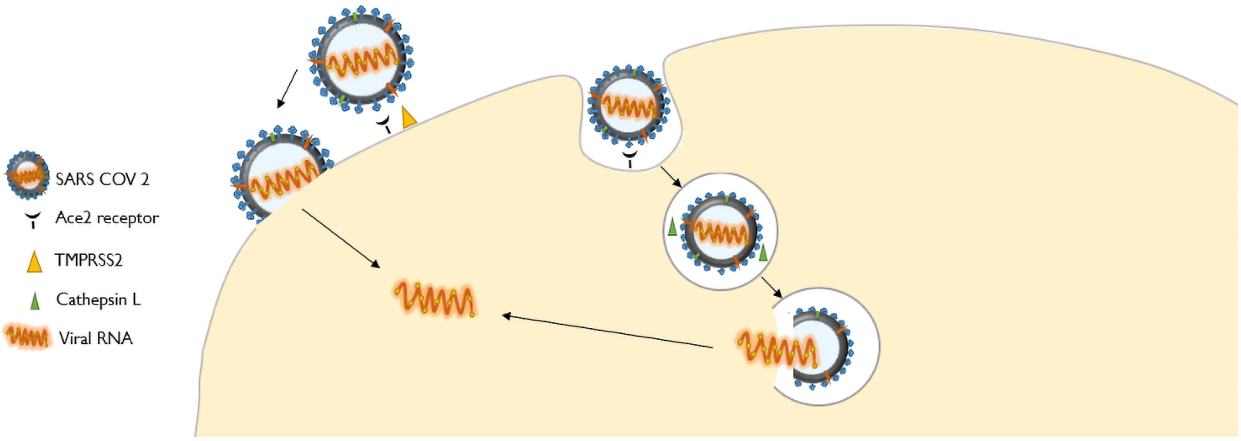


Figura 3 El mecanismo de entrada a las células. Hay más de un mecanismo por el cual el virus SARS-CoV-2 puede ingresar a las células y causar infección. El más descrito, se refiere a la escisión realizada por la proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2), la cual está siendo responsable del cambio conformacional en la proteína S necesario para que se produzca la entrada a la célula (Rossi *et al.* 2020; Hoffmann *et al.* 2020). Otra posible forma de que el virus ingrese a la célula es después de unirse al receptor ACE-2; el virus ingresa a la célula a través de la endocitosis. En este caso, la liberación de ARN al citoplasma se produce después de la fusión, donde la escisión proteolítica entre las subunidades S1/S2 está mediada por la unión mediada por la catepsina L, que es una proteasa lisosomal (Gomes *et al.* 2020) (imagen propia)

de la salud, al tiempo que protege a la población de múltiples enfermedades, e incluso ha permitido la erradicación de enfermedades, que es lo que el mundo necesita en caso de una pandemia. Las vacunas se pueden clasificar según su composición, en particular según el origen o la estructura del antígeno, en las llamadas plataformas: entre ellas se tiene, virus vivos atenuados, virus inactivados, ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), vector viral replicante, el vector viral no replicante, la subunidad proteica y las VLP; todas ellas, son plataformas utilizadas para desarrollar vacunas COVID-19. Las de última generación ya no son antígenos aislados directamente de patógenos, sino que provienen de recombinación genética, y dentro de estas abordaremos aquí el tema de las vacunas basadas en VLP.

Las vacunas VLP llevan mucho tiempo bajo el escrutinio de la comunidad científica. Las VLP representan una nanoestructura basada en proteínas capaz de penetrar en el interior de las células y que contiene el antígeno o antígenos de la cápside viral con una disposición definida con alta densidad de epítopos de linfocitos B y T. Las VLP no contienen material genético, lo que las hace no infecciosas e incapaces de replicarse; por lo tanto, las VLP son más inofensivas que otros tipos de vacunas candidatas (Fuenmayor *et al.* 2017; Roldao *et al.* 2010; Programas COVID-19 2021). Además, las VLP han demostrado ser altamente inmunogénicas y, por lo tanto, pueden estimular respuestas inmunes innatas, humorales y celulares (Tan y Jiang 2014; Huang *et al.* 2017).

Las VLP han sido ampliamente estudiadas por la comunidad científica, ya que han llamado mucho la atención no solo por sus ventajas de seguridad, sino también por su capacidad para conseguir una buena inmunogenicidad a partir de una cantidad no muy grande de antígeno, que puede ser especialmente interesante en ciertos contextos, como el de la pandemia. Las vacunas VLP tienen algunos puntos negativos, como el hecho de que estas vacunas a menudo no son de una sola administración y tienen altos costos considerando el rendimiento durante la producción. Para aumentar la eficacia de la vacuna, normalmente es necesario agregar adyuvantes a la formulación de la vacuna, como veremos más adelante. Sin embargo, esta necesidad de agregar adyuvantes también puede verse como una desventaja adicional en la producción de vacunas VLP, porque complica su formulación (Scotti y Rybicki 2013). Además, es necesario tener en cuenta que los cambios conformacionales del antígeno y/o la agregación de partículas pueden afectar negativamente a la seguridad y eficacia de la vacuna (Jain *et al.* 2015). Las VLP son, por sí mismas, más inmunogénicas que las proteínas aisladas e incluso los agregados de proteínas porque su estructura presenta una disposición de epítopos repetitiva.

El principio en el que se basa las VLP es imitar la estructura del virus, por lo que su estructura depende del virus que causa la enfermedad, ya sea en términos de morfología, composición bioquímica y tamaño. Además, según el virus sea envuelto o no, las VLP podrán ser envueltas o no (Cimica y Galarza 2017). Normalmente, las VLP envueltas (eVLP) obtienen la membrana lipídica de las células huésped mediante gemación, por lo que su composición es más compleja y su aprobación regulatoria más difícil debido a la incertidumbre de los componentes en la célula huésped. Las VLP normalmente son muy inmunogénicas e inducen una buena respuesta inmune humoral y celular. Se ha logrado aumentar la

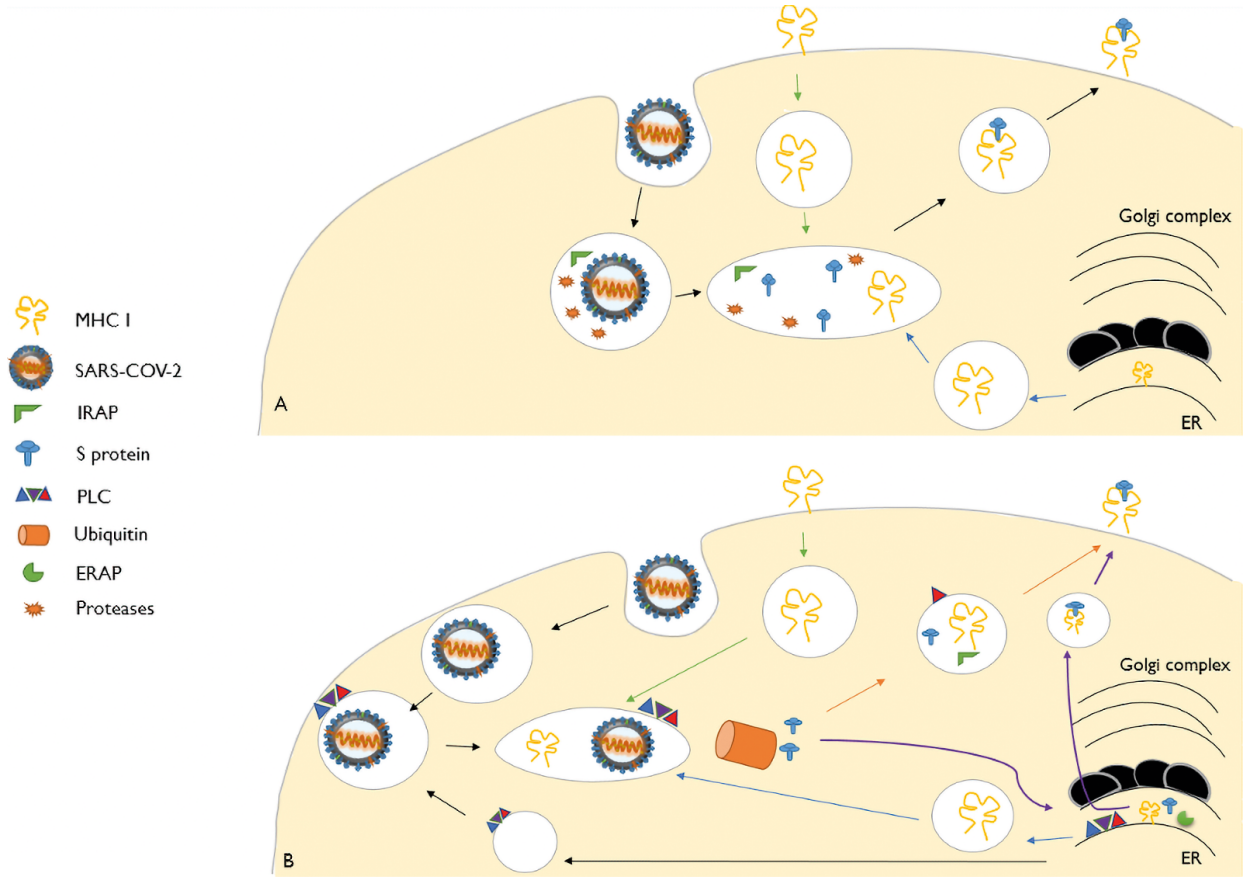


Figura 4. Internalización del SARS-CoV-2 en APC y mecanismos de presentación cruzada A: Vía vacuolar. Según la vía vacuolar, el antígeno exógeno luego de ser internalizado es degradado en el lisosoma por proteasas, y los péptidos resultantes de las escisiones se cargan en Moléculas del MHC I, que a continuación se presentarán en la membrana plasmática (Embgenbroich y Burgdorf 2018; Cruz *et al.* 2017). Las flechas verdes y las flechas azules son caminos alternativos entre sí. B: vía del endosoma al citosol. Después de la internalización, los antígenos escapan del compartimento endocítico, donde ya se habían establecido los componentes del complejo de carga de péptidos (PLC), hacia el citoplasma. En el citoplasma, los antígenos acaban uniéndose a la ubiquitina y degradándose. Los péptidos de esta degradación serán transportados por el Transportador Asociado al Procesamiento de Antígenos (TAP) al retículo endoplásmico (ER), o de regreso al endosoma, donde serán recortados por la aminopeptidasa del retículo endoplásmico (ERAP) o la aminopeptidasa regulada por insulina (IRAP), respectivamente. Finalmente, los péptidos se unirán al MHC I y procederán a la membrana plasmática, para luego ser presentados a los linfocitos Tc (43,44). Las flechas verdes y las flechas azules son caminos alternativos entre sí. Las flechas naranjas/flechas moradas son caminos alternativos entre sí (imagen propia)

actividad de las partículas que controlan la disposición de las VLP evitando la inclusión de componentes del virus que son capaces de inhibir el sistema inmunológico (Cimica y Galarza 2017).

Además, hay dos características esenciales de las VLP que son cruciales para que puedan interactuar con las células del sistema inmunológico. Estas características son el hecho de que su estructura presenta una superficie de epítopo muy repetitiva, y su tamaño. El tamaño es importante porque facilita el drenaje de las VLP a los órganos linfoides a través del sistema linfático, ya que las VLP tienen la capacidad de ser capturadas, procesadas y transportadas por células del sistema inmunológico, como por ejemplo las células dendríticas (DC). Además, tienen un tamaño similar al del virus indicado para la interacción con las células presentadoras de antígenos (APC) (Mohsen *et al.* 2018; Grgacic y Anderson 2006). Esta capacidad de tráfico hacia los órganos linfoides secundarios, como los nódulos linfáticos, lugar donde las APC presentan el antígeno a los linfocitos T CD4+ maduros, a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), explica su gran capacidad para inducir respuestas inmunes.

Además, la activación de los linfocitos CD4+ también permitirá que se produzca la segunda fase de activación de los linfocitos B. Aunque los linfocitos B son capaces de reconocer el antígeno/VLP, necesitan la interacción con un linfocito CD4+ para poder activarse por completo e iniciar la proliferación. Algunos de estos linfocitos B activados se diferenciarán en células plasmáticas y producirán anticuerpos (respuesta inmune humoral) (Seifert y Kuppers 2016). Ya se ha demostrado que las VLP son capaces de generar respuestas inmunes mediadas por linfocitos CD8+ (Cubas *et al.* 2009). Los linfocitos CD8+

normalmente se activan a través del MHC I. Son los antígenos endógenos los que normalmente conducen a la activación del MHC I, lo más común es que proteínas mal plegadas sean las responsables de esta activación (Mohsen *et al.* 2018; Storni y Bachmann 2004). Sin embargo, a través de la presentación cruzada es posible que antígenos exógenos activen el MHC I y, en consecuencia, en estas condiciones se pueda lograr una respuesta inmune mediada por linfocitos CD8+ (Seifert y Kuppers 2016).

Hay varios mecanismos posibles por los cuales podría ocurrir la presentación cruzada, sin embargo, hay dos vías principales por las cuales ocurre la activación del MHC I por antígenos exógenos: la vía vacuolar y la vía de endosoma a citosol (Embgenbroich y Burgdorf 2018; Cruz *et al.* 2017). La figura 4 es una representación de estos mecanismos de entrada del virus SARS-CoV-2.

Como podemos ver, las APC, y en particular las DC, juegan un papel importante en la generación de estas respuestas inmunes. La activación de los linfocitos B y T, y luego la formación de la memoria inmunológica, son el principal objetivo de la vacunación, y las VLP han demostrado muchas veces ser capaces de inducirla (Lee *et al.* 2019; Oisson *et al.* 2007). Para mejorar estas respuestas del sistema inmunológico, las vacunas VLP suelen contener adyuvantes en su composición. Los adyuvantes pueden considerarse una clase de compuestos inmunomoduladores que son capaces de mejorar la actividad del sistema inmunológico mediante diversos mecanismos; podría ser de gran utilidad en niños y personas mayores de 65 años, inmunocomprometidas o personas con otras comorbilidades, que responden menos a la vacuna por tener un sistema inmunológico más frágil y/o inmaduro (Coffman *et al.* 2010). Además de estimular las respuestas inmunitarias, los adyuvantes también pueden tener otros usos clínicos; al mejorar mejores respuestas del sistema inmunológico, pueden, en muchos casos, permitir el uso de dosis más pequeñas de antígeno por vacuna para obtener una inmunización exitosa, permitiendo así reducir los costos de las vacunas y el número de dosis necesarias a tomar. Además, la inmunomodulación permite aumentar la velocidad con la que se genera la respuesta inicial.

Cuando estamos produciendo una vacuna, nuestro objetivo es que proporcione una protección a largo plazo, y los adyuvantes también son ventajosos en este sentido ya que tienen la capacidad de estimular la memoria inmunológica (Cimica y Galarza 2017). Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos con una mezcla de un antígeno y un adyuvante no se pueden extrapolar directamente a otro antígeno. Los adyuvantes deben elegirse según el antígeno específico y el tipo de respuesta del sistema inmunológico requerida; además, una vacuna puede contener varios adyuvantes (CHMP 2003). Hoy en día la evolución es grande y se están estudiando muchos adyuvantes. Incluso se están desarrollando combinaciones de adyuvantes (Weinberger 2018). Sin embargo, no siempre se comprende completamente el mecanismo de acción exacto mediante el cual actúa cada uno de ellos.

2. MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE VLPS – SISTEMA DE EXPRESIÓN

Después de conocer adecuadamente el virus, todavía queda mucha investigación por hacer. Para producir VLP, primero es necesario definir qué sistema de producción, dentro de las diversas posibilidades, será el más adecuado. Los métodos de producción de VLP pueden ser bastante complejos y hay varios sistemas de expresión disponibles. Por ello es importante tener en consideración varios factores a la hora de elegir el método de producción que vamos a utilizar para las VLPs. En primer lugar, para poder elegir correctamente qué sistema de expresión vamos a utilizar, y dado que el sistema de expresión determina algunas de sus propiedades, es fundamental considerar las particularidades de las partículas que se están produciendo. Es decir, tenemos que saber si nuestras partículas necesitarán modificaciones postraduccionales o si tendrán que estar envueltas o no (Fuenmayor *et al.* 2017).

Los sistemas de expresión que tenemos actualmente a nuestra disposición para la producción de VLP son plantas, bacterias, levaduras, insectos y células de mamíferos.

2.1. Bacterias: una oportunidad de investigación

Las bacterias se han utilizado durante mucho tiempo para producir diversos compuestos proteicos. Hay varios ejemplos, como el caso de diversas hormonas, citocinas e incluso insulina (proteínas recombinantes) producidas por *Escherichia coli* (*E. coli*). Además de estas, ya se han producido no pocas VLP a partir de bacterias, generalmente *E. coli*. *E. coli* se puede utilizar como método de producción de VLP en los casos en que sean relativamente simples y sea posible que se produzca el correcto plegamiento de la proteína. Las VLP simples que comprenden solo una o dos proteínas en su estructura suelen ser producidas por bacterias o levaduras (Roldao *et al.* 2010; Zeltins 2013).

E. coli, como sistema de expresión, presenta varias peculiaridades que lo convierten en un atractivo huésped de expresión proteica, y tiene un gran potencial en términos de aplicaciones de síntesis proteica simple. Este sistema de producción tiene varias ventajas, pero también algunas limitaciones, como podemos ver en la tabla 1. El hecho de que *E. coli* sea capaz de presentar altos niveles

Tabla 1. Tabla resumen de ventajas y desventajas de diferentes sistemas de expresión (adaptado/modificado de Huang *et al.* 2017; Deng *et al.* 2018)

	E.coli	Yeast	Células de insectos	Plantas (Deng *et al.* 2018)	Células de mamíferos
VLPs envueltas	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Rendimiento	+++	++	++	++	+
Producción a escala	+++	+++	++	++	++
Coste de producción	+	+	++	++	+++
Complejidad VLP	+	++	+++	++	++
Modificaciones Post Translación					
Enlace Disulfuro	No	Sí	Sí	Sí	Sí
O-glicosilación	No	Sí	Sí	Sí	Sí
N-glicosilación	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Fosforilación	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Acilación	No	Sí	Sí	Sí	Sí
γ-Carboxilación	No	No	No	No	Sí

+ bajo; ++ medio; +++ alto

de producción, y ser fácilmente escalable, la convierte en una producción de bajo coste. Así, las producciones de bajo costo permiten que las vacunas lleguen a los países más pobres, y no solo a los países desarrollados, como suele ocurrir (Huang *et al.* 2017). La verdad es que el acceso a la vacunación no se da por igual en los países desarrollados que en los países en desarrollo, por lo que también debería preocuparnos que los costos de desarrollo y producción de vacunas y medicamentos sean lo más bajos posible, para que todo el mundo pueda acceder a las vacunas.

Existen algunas limitaciones en cuanto a la producción de VLP por parte de *E. coli* que hacen que en ocasiones no sea posible elegir este sistema de expresión. Uno de los problemas que presenta el sistema de expresión de *E. coli* es su incapacidad para producir modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones son extremadamente importantes en la estabilidad, actividad e inmunogenicidad de las partículas producidas. Además, *E. coli* también presenta la capacidad de producir endotoxinas, como el lipopolisacárido (LPS), y una vacuna inyectable contaminada con endotoxinas puede provocar, por ejemplo, un shock séptico (Huang *et al.* 2017; Zeltins 2013; Kim y Kim 2016).

Además, las VLP tienen otro problema, que se debe al hecho de que las proteínas recombinantes son a menudo insolubles y, en consecuencia, forman cuerpos de inclusión que surgen debido a un proceso de plegamiento de proteínas ineficiente. La formación de estos agregados proteicos también puede verse favorecida por el elevado número de proteínas en el citoplasma de la bacteria, ya que dificulta el plegamiento actual. Se han estudiado varias estrategias para abordar estos problemas, incluido a) utilizar temperaturas de expresión más bajas, lo que provoca una cinética de plegado más baja y reduce las interacciones hidrofóbicas implicadas en la autoagregación; b) coproducción de acompañantes; c) uso de proteínas compañeras de fusión, dado que las etiquetas de fusión juegan un papel importante tanto en la solubilidad de las VLP como en su posterior purificación, sin embargo su mecanismo de acción no se comprende bien; d) y, por supuesto, las condiciones de cultivo tendrán impacto (Costa *et al.* 2014).

Actualmente se encuentra en el mercado una vacuna VLP producida a partir de *E. coli*. Hecolin es una vacuna profiláctica contra la hepatitis E, aprobada en China y fabricada por Xiamen Innovax Biotech Co. Esta vacuna es para personas mayores de 16 años y se recomienda administrarla a personas con alto riesgo de desarrollar la infección de la hepatitis E (Grupo HEVW 2014).

Sin embargo, en resumen, debemos mantener la idea de que las VLP producidas por *E. coli* todavía se utilizan principalmente solo en investigación y estudios preclínicos.

2.2. Levadura: el sistema de expresión más probado

Las levaduras constituyen un sistema de expresión atractivo que nos permite producir VLP. Al igual que *E. coli*, también tiene algunas ventajas y desventajas que hay que calibrar a la hora de elegir el sistema de expresión que vamos a utilizar. Las levaduras más utilizadas en la producción de VLP son *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) y *Hansenula polymorpha* (*H. polymorpha*). Las levaduras, a diferencia de *E. coli*, son microorganismos eucariotas, lo que se refleja en algunas particularidades y conlleva algunas ventajas. Aunque, en algunos aspectos existen similitudes en estos dos sistemas de producción que se comentan a continuación.

La producción de levadura tiende a ser de bajo costo, la fermentación podría ampliarse fácilmente, por lo que normalmente se logran buenos rendimientos de producción (Kim y Kim 2016). Estas características siguen siendo compatibles con la posibilidad de producir vacunas con costos de producción relativamente asequibles, lo cual es importante para su uso en los países menos desarrollados. Adicionalmente también es importante considerar que las industrias para la producción de vacunas VLP, más aún como en este caso producidas en un sistema inocuo, no tienen los mismos requisitos de fabricación, debido a que las condiciones de contención y seguridad de los operadores, por lo tanto, no son tan exigentes como en el caso de la producción de vacunas tradicionales en las que se producen patógenos.

Otra característica de las VLP producidas en levaduras es el hecho de que pueden sufrir algunas modificaciones postraduccionales, como se describe en la tabla 1. Además, al contrario de lo que sucede con las VLP producidas en *E. coli*, con *S. cerevisiae* como sistema de producción, las proteínas producidas muestran una mayor solubilidad. Esto se relaciona con que el RE actúa como vigilante en el plegamiento de proteínas, lo cual no ocurre en *E. coli*, ya que los microorganismos procarióticos no están dotados de estructuras de membrana interna, y posteriormente ocurre comúnmente la formación de cuerpos de inclusión (Zeltins 2013; Kim y Kim 2016).

A diferencia de lo que ocurrió con las vacunas producidas por *E. coli*, que solo existen vacunas en el mercado chino, ya existen varias vacunas basadas en levadura aceptadas en Europa. Estas incluyen Engerix-B y Recombivax HBTM, que son vacunas para la hepatitis B, producidas por GlaxoSmithKline y Merck, respectivamente. También contra el virus del papiloma humano (VPH) ya existen vacunas profilácticas basadas en VLP de levadura autorizadas en Europa, entre ellas Gardasil – HPV 16, 6, 11 y 18, y Gardasil 9 – HPV 6, 11, 1618, 31, 33, 45, 52 y 58 (Ema *et al.* 2016).

2.3. Baculovirus/Células de insectos: uno de los más utilizados

Los baculovirus son virus que infectan naturalmente las células de los insectos, y el baculovirus más utilizado como sistema de expresión es el *Nucleopoliedrovirus multiple* de la polilla *Autographa californica* (AcMNPV) (Chambers *et al.* 2018). En los últimos años el sistema de vectores de expresión de bacoluvirus ha experimentado un enorme crecimiento. Hoy en día es uno de las más utilizados, y ya cuenta con varios productos en el mercado, entre ellos una vacuna bivalente VLP contra el VPH, Cervarix, producida por GlaxoSmithKline.

La producción basada en este sistema de expresión eucariota es compleja, ya que existen muchos pasos previos a la producción de las propias VLP. Para que las células de insecto sean capaces de producir VLPs es necesario que estén previamente infectadas con baculovirus recombinantes, y antes de eso, el bacoluvirus debe transformarse con el plásmido purificado para tener el material genético correspondiente a nuestras proteínas de interés (Felberbaum 2015). Hay que tener en cuenta la composición de las VLP, por lo que si la partícula está compuesta por más de una proteína hay dos opciones a) se pueden utilizar varios baculovirus y cada uno porta un gen – coinfección b) un solo baculovirus presenta varios genes – coexpresión; También es posible una combinación de estos dos métodos (Sokolenko *et al.* 2012).

Como todos los demás sistemas de expresión, las células de baculovirus/insecto también tienen ventajas y desventajas, y son más adecuadas para algunos tipos de VLP, mientras que otros sistemas de expresión son adecuados para otros tipos. Los diferentes VLP tienen diferentes particularidades, por lo que debemos tener esto en cuenta a la hora de elegir qué sistema de producción pretendemos utilizar para la producción, como se dijo antes; por lo tanto, es importante tener en cuenta que la producción de eVLP es más compleja si se la compara en con las de VLP sin envoltura. A pesar de esto, el sistema de vector de expresión de bacoluvirus ha demostrado ser una buena opción para la producción de eVLP en numerosas ocasiones (Ho *et al.* 2004; Metz *et al.* 2013; Dai *et al.* 2018).

Una clara ventaja de este sistema de expresión es el hecho de que permite modificaciones postraduccionales muy similares a las obtenidas a través de células de mamíferos. Sin embargo, esta particularidad también nos lleva a lo que podemos considerar una limitación, que es el hecho de que es incapaz de sintetizar N-glicanos tan complejos como los producidos por células de mamíferos, lo que impactará en su función (Liu *et al.* 2013). Cuando pensamos en métodos de producción, también tenemos que pensar en otra cosa: la duración del proceso.

Imaginemos un contexto de pandemia: necesitamos producir muchas vacunas rápidamente, por lo que la velocidad de producción asociada aquí es sin duda una ventaja.

Pero no hace falta ir tan lejos, incluso las vacunas contra la gripe disponibles cada año serían mucho más ventajosas si pudiéramos producirlas en un período de tiempo más corto, porque así podríamos evitar la posibilidad de que la vacuna no coincida con el virus circulante, porque no tuvimos que empezar a producirla con un año de antelación, como hacemos actualmente. Además, el hecho de que las células de insectos crezcan en suspensión mejora la capacidad de producción. En términos de desventajas, podemos señalar que los costos de producción son mayores, lo que limita el acceso a la vacunación, y los rendimientos alcanzados son menores en comparación con lo que ocurre con los sistemas que comentamos antes (Felberbaum 2015).

2.4. Plantas: ¿el objetivo son las vacunas comestibles?

Aunque no es el sistema de producción más utilizado, y aún no existen en el mercado VLP producidas a través de plantas, han ido ganando espacio en la producción de proteínas recombinantes, como anticuerpos recombinantes, por ejemplo, y, por supuesto, VLP. Las plantas como huéspedes del sistema se pueden ampliar fácilmente, son de bajo costo y capaces de obtener con un alto rendimiento. Además, el riesgo de contaminación no es elevado, lo que los convierte en una buena opción para la producción de proteínas. La producción de vacunas VLP a partir de plantas tiene un gran potencial en términos de administración oral. Sin embargo, la posible administración de vacunas comestibles requiere mucho trabajo para establecer las dosis a administrar para lograr una vacunación eficaz.

En los casos en los que las plantas utilizadas como sistema transitorio de producción de proteínas formen parte del grupo que utilizamos como alimento o pienso, el proceso de purificación suele ser menos complejo. Sin embargo, la planta del tabaco es la que aparece en la literatura como la más utilizada en la producción de VLP de origen vegetal, y en ese caso, tenemos el hecho de que se deben eliminar altas concentraciones de nicotina durante los pasos posteriores. Además, aunque las plantas son capaces de sintetizar modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, algunas modificaciones postraduccionales difieren entre plantas y mamíferos. No obstante, ya es posible superar estos problemas a través de procesos de ingeniería, a partir de los cuales es posible cambiar estas diferencias (Abranches *et al.* 2005; Fischer *et al.* 2004). También se debe considerar que las células procarióticas no tienen la capacidad de producir glicosilación, e incluso en células de levaduras e insectos la capacidad de producir estas modificaciones postraduccionales es limitada. Por tanto, aun así, la glicosilación en plantas puede verse como ventajosa (tabla 1) (Burnett y Burnett 2020).

Para que la planta produzca cualquier tipo de proteínas es necesario que el material genético que contiene su información esté colocado en las células de la planta. La transformación estable es una opción, sin embargo, es importante considerar que no todas las plantas son capaces de agregar nueva información a su genoma, o al menos no todas pueden hacerlo fácilmente. A esto se suma el hecho de que el uso de plantas transgénicas está muy regulado. Debido a estas limitaciones, cada vez se utiliza más la alternativa al uso de plantas transgénicas, la expresión transitoria. Para que se produzca la expresión transitoria existen tres sistemas de administración diferentes: a) bombardeo biolístico, b) agroinfiltración y c) por vector viral (Canto 2016).

Aunque, como ya se ha comentado, todavía no existen en el mercado vacunas elaboradas a partir de plantas. Existen muchos estudios publicados que muestran la eficacia y seguridad de estas vacunas (Pillet *et al.* 2019; Chichester 2018). Por tanto, se espera que pronto aparezcan en el mercado.

2.5. Células de mamíferos: la producción de las VLP más complejas

Las líneas celulares de mamíferos también son un sistema de expresión ya estudiado para la producción de VLP. La mayor ventaja de las VLP producidas a través de líneas celulares de mamíferos son las modificaciones postraduccionales obtenidas, como podemos ver en la tabla 1, cuya complejidad es mucho mayor que las modificaciones postraduccionales conseguidas mediante otros métodos. Sin embargo, los costos de producción y la dificultad de producir a gran escala son desventajas que dificultan el uso de esta producción fuera de la investigación (Fuenmayor *et al.* 2017). Para producir VLP a través de células de mamíferos se pueden utilizar dos métodos: la generación de líneas estables o la transfección transitoria.

Al optar por la generación de una línea celular estable para la producción de VLPs, se deben transducir las células con un vector apropiado, y luego de seleccionar las células recombinantes que produzcan la proteína de interés, se debe establecer el banco de células maestras (Fontana *et al.* 2014). Desde este enfoque, se ha demostrado que se puede lograr una producción continua del antígeno proteico a lo largo del tiempo y que puede inducir títulos de anticuerpos similares a otras vacunas que ya están en el mercado (Fontana *et al.* 2015). Sin embargo,

se necesitan algunos meses para establecer una línea celular estable.

Al contrario de lo que ocurre en la producción de VLP a través de una línea estable, al optar por la transfección transitoria el ADN extraño no se integra al genoma del huésped, y en consecuencia al cabo de un tiempo las células dejan de producir las VLP, porque pierden el material genético. Por este motivo, la transfección transitoria resulta especialmente interesante en ensayos preclínicos en los que todavía estamos intentando comprender el potencial de las VLP, ya que este método de producción tiene la ventaja de poder establecerse con bastante rapidez, por lo que es posible disponer en unas pocas semanas de una cantidad de proteína razonable para poner en práctica las pruebas (Fuenmayor *et al.* 2017; Cervera *et al.* 2013).

En la literatura se describen varias líneas celulares para la producción de VLP, por ejemplo, células vero, HEK 296 y de ovario de hámster chino (CHO). Las VLP producidas a través de estas líneas celulares ya han demostrado en pruebas con animales que son altamente inmunogénicas (Buffin *et al.* 2019). Sin embargo, todavía no existen en el mercado vacunas VLP producidas con esta tecnología. Esto puede deberse a varias razones, como por ejemplo los elevados costes de producción y la dificultad de una producción a gran escala.

3. VACUNAS CANDIDATAS VLP SARS-COV-2

En cuanto al SARS-CoV-2, actualmente hay cinco vacunas basadas en VLP de la proteína de pico (proteína S) del SARS-CoV-2 en desarrollo en ensayos clínicos (tabla 2).

Debido a que la proteína S desempeña un papel crucial en la entrada del virus a las células, se espera que sea el antígeno clave de las vacunas.

3.1. Las plantas como sistema de producción y la tecnología Proficia®

En marzo de 2020, Medicago, una empresa de biotecnología norteamericana, en asociación con GlaxoSmithKline, anunció que había podido desarrollar VLP del SARS-CoV-2 (Medicago 2021). La vacuna tiene una partícula similar al coronavirus con trímeros de proteína S en la bicapa lipídica (Gobeil *et al.* 2021). En cuanto al sistema de expresión, Medicago ha desarrollado la tecnología Proficia®. En primer lugar, esta tecnología se desarrolló como sustituto del sistema de producción convencional a base de huevos para la producción de vacunas contra la influenza. Brevemente, esta tecnología consiste en sintetizar un vector que contiene la información genética correspondiente a la(s) proteína(s) de interés; introducir el plásmido en un vector bacteriano específico de la planta (*Nicotiana benthamiana*, *N. benthamiana*) mediante infiltración al vacío cuando las plantas se sumergen en una solución que contiene el vector; incubar las plantas durante 4-6 días, permitiendo la expresión transitoria de proteínas y la formación de VLP; cosechar las plantas para poder extraer y aislar las VLP; y finalmente, purificar las VLP obteniendo el material requerido para la producción de vacunas.

La vacuna basada en las VLP producida por Medicago Inc. se encuentra en la fase 2/3 de los ensayos clínicos, en un «Estudio de fase 2/3, aleatorizado, ciego al observador

Tabla 2. Resumen de las principales características de las cinco vacunas basadas en VLP del SARS-CoV-2 en ensayos clínicos

Puesta a punto	Vacuna	Sistema de expresión	Tecnología	Fase de ensayo clínico	Referencias
Medicago	CoVLP	Plantas	Proficia®	Fase 2/3	VLP (2021) Study (2021)
VBI Vaccines Inc.	VBI-2902a	Células de mamíferos	No publicado	Fase 1/2	Safety (2021) Fluckiger *et al.* (2021)
Radboud University	ABNCoV2 virus cápside	No publicado	SpyTag/SpyCatcher	Fase 1	Safety (2021)
Serum Institute of India + Accelagen Pty + SpyBiotech	RBD SARS-CoV-2 HBsAg VLP vacuna	No publicado	SpyTag/SpyCatcher	Fase 1/2	COVID-19 (2021) Taylor (2021)
The Scientific and Technological Research Council of Turkey	SARS-CoV-2 VLP vacuna	No publicado	No publicado	Fase 2	Study (2021)

y controlado con placebo para evaluar la seguridad, eficacia e inmunogenicidad de una vacuna COVID-19 de partículas similares al coronavirus recombinante en adultos de 18 años o más». El volumen de 0,5 ml de vacuna intramuscular que se está probando contiene 3,75 µg de VLP con adyuvante AS03 (Estudio 2021).

Los resultados de la fase 1 ya se conocen y fueron positivos. En cuanto a las cuestiones de seguridad, no se registraron efectos adversos graves. Las respuestas inmunes provocadas fueron fuertes y fueron potenciadas por el adyuvante. Se obtuvo una evaluación beneficio/riesgo satisfactoria (Ward *et al.* 2020; Medicago 2020). También se han comunicado ya los datos de la fase 2. La vacuna en estudio con el adyuvante AS03 ha demostrado ser capaz de inducir títulos elevados de anticuerpos, tanto en adultos como en personas mayores, incluso en comparación con títulos en personas que se estaban recuperando de la COVID-19. Además, no se registraron efectos adversos graves con la administración de la vacuna (Medicago e GSK 2021; Gobeil *et al.* 2021). Los efectos adversos más comunes fueron dolor en el lugar de la inyección, fatiga y dolores musculares (Gobeil *et al.* 2021). Con estos alentadores resultados, ahora estamos a la espera de completar la fase clínica 3.

3.2. Vacuna basada en células de mamíferos

«BVI vacunas Inc.» ya está produciendo una vacuna basada en VLP contra el SARS-CoV-2, que actualmente se encuentra en la fase 1/2 de estudios clínicos, donde se estudiará su seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad. El ensayo clínico VBI-2902a es un estudio aleatorizado, ciego al observador, de aumento de dosis (5 µg y 10 µg de proteína S) y controlado con placebo (Safety 2021). La vacuna en estudio es una vacuna basada en eVLP; esta vacuna es una vacuna monovalente que presenta proteína S en la superficie del eVLP. Además, la vacuna también lleva fosfato de aluminio como adyuvante (Our Pipeline 2021). BVI Vaccines Inc. presenta una proteína S de prefusión modificada debido a que estas eVLP mostraron un mayor rendimiento en investigaciones anteriores, lo cual es un factor muy importante para la producción a gran escala, y además demostraron ser más inmunogénicas (Vbi Vaccines 2020).

Las VLP envueltas para la producción de estas vacunas se produjeron mediante transfección transitoria en células de riñón embrionario humano (293T-3F6). Además, la forma de prefusión estabilizada de la proteína S se obtuvo mediante la mutación del sitio de escisión de la furina, a partir del intercambio de aminoácidos, y también se añadió una cola G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) a la envoltura de la VLP (Fluckiger *et al.* 2021). Anteriormente, en otros estudios, se había descrito que la alteración de otros dominios transmembrana por el de la envoltura proteica del VSV-G había ayudado en el pseudotipado, y por tanto aumentado el rendimiento (Garrone *et al.* 2011). Un rendimiento favorable siempre es muy importante en la producción a gran escala, pero más aún en un contexto epidémico donde es necesario producir rápidamente un gran número de dosis. Se espera que el estudio clínico en curso finalice en junio de 2022 (Safety 2021).

3.3. Tecnología SpyTag/SpyCatcher

La densidad de antígenos unidos a la VLP y su orientación de unión a la VLP afecta la eficacia de las vacunas VLP. La tecnología SpyTag/SpyCatcher surgió como una opción para superar estos desafíos y es propiedad de SpyBiotech. La tecnología del «superpegamento» de la proteína SpyTag/SpyCatcher se basa en el establecimiento de un vínculo estable e irreversible entre SpyTag (péptido) y SpyCatcher (proteína que se une a la VLP), como podemos ver en la figura 5. Las VLP y el antígeno, que también deben modificarse para tener un SpyTag o SpyCatcher, cuando se mezclan e incuban, ocurre la unión del antígeno a la VLP a través de una conexión entre SpyTag y SpyCatcher (Thrane *et al.* 2016; Janitzek *et al.* 2016; Tecnología 2021). Esta nueva tecnología aporta indudables ventajas a la producción de VLP y promete ser más sencilla y aumentar la densidad de presentación de antígenos.

Ya hay dos vacunas contra la COVID-19 en ensayos clínicos basadas en esta tecnología. Los estudios preclínicos de vacunas basadas en esta tecnología demostraron que con dosis bajas era posible inducir respuestas antigénicas robustas en ratones y cerdos (Tan *et al.* 2021). También tienen la ventaja de permitir fácilmente la conjugación con otros antígenos, si es necesario. Además de mostrar una alta inmunogenicidad, también presenta las ventajas de ser termoestable, y la posibilidad de ser liofilizada y luego de su reconstitución no presentar una disminución relevante en su actividad. Si esta característica es genéricamente transversal a todas las vacunas obtenidas con la tecnología SpyTag/SpyCatcher, aquí podemos tener la oportunidad de producir vacunas que sean más fáciles de transportar y, en consecuencia, tengan menores costos (Tan *et al.* 2021).

La Universidad de Radboud (Nimega, Países Bajos) está actualmente a cargo de un ensayo clínico de una vacuna basada en VLP de la cápside: ABNCoV2. Detrás de esta vacuna hay un consorcio: AdaptVac, ExpreS2ion Biotechnologies, el Centro Médico de la Universidad de Leiden, el Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de Tubinga, el Centro Médico de la Universidad de Radboud, el Departamento de Inmunología y Microbiología de la Universidad de Copenhague y el Laboratorio

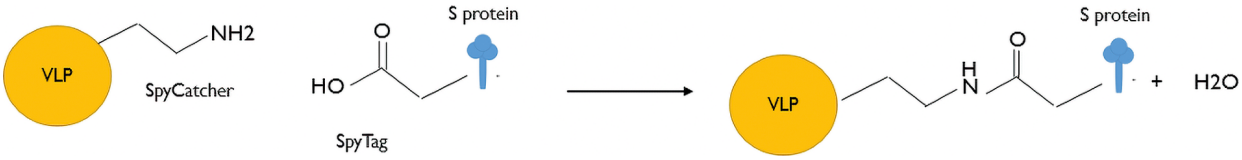


Figura 5. SpyTag/SpyCatcher enlazado. La VLP está unida al SpyCatcher y el antígeno (en este caso, la proteína S) está unido al SpyTag. SpyCatcher y SpyTag tienen la capacidad de unirse covalentemente, por lo que la VLP y el antígeno también están unidos entre sí. La VLP funcionará como portador del antígeno (imagen propia)

de Virología de la Universidad de Wageningen (Países Bajos). El ensayo clínico se encuentra en fase 1, cuyo objetivo es estudiar la seguridad y la posible manifestación de efectos adversos. Además, trata también de entender si efectivamente existe una respuesta inmune derivada de la administración de la vacuna. Se estudiarán dosis ascendentes (6 µg-70 µg), en siete grupos (n = 6), así como formulaciones con y sin adyuvante MF59. Todos los voluntarios recibirán dos inoculaciones y el aumento de la dosis se realizará solo en ausencia de señales de seguridad definidas por el protocolo (Seguridad y tolerabilidad 2021). Es la primera vez que esta vacuna se estudia en humanos, e incluso está en fase de reclutamiento, pero ya se han desarrollado estudios en modelos y animales (La vacuna 2021). Los datos preclínicos demostraron fuertes resultados de inmunogenicidad. Hubo formación de anticuerpos neutralizantes en dosis más altas tanto con adyuvante como sin adyuvante, y en dosis más bajas con adyuvante (Nordic *et al.* 2021).

También el Serum Institute of India, Accelagen y SpyBiotech están desarrollando una vacuna que ya se encuentra en ensayos clínicos basada en la tecnología SpyTag/SpyCatcher. La vacuna RBD SARS-CoV-2 HBsAg VLP que está desarrollando Serum Institute of India, Accelagen y SpyBiotech se encuentra en la fase 1/2 de dos estudios clínicos (seguimiento y panorama de la vacuna COVID-19, 2021). El número de registro del primero en presentarse fue ACTRN12620000817943. Este ensayo clínico es aleatorizado, multicéntrico, controlado con placebo y el placebo contiene una suspensión de hidróxido de aluminio. Los participantes recibirán la vacuna del estudio (o placebo) por vía intramuscular los días 0 y 28. Se probarán dos dosis, 50 µg y 250 µg (Taylor 2019a).

El otro ensayo clínico con número de registro ACTRN12620001308987 también es un ensayo aleatorizado, multicéntrico y controlado con placebo. En este ensayo también hay dos dosis diferentes, 20 µg y 50 µg y aún con dos adyuvantes diferentes: adyuvante de alumbre solo, adyuvante de alumbre más CpG 1018 (150 mc) (se tomó la decisión de transcribir la información tal como aparece en la literatura, aunque no son unidades del SI [sistema internacional], ya que sabemos que en la literatura la correspondencia al SI no es correcta), o adyuvante de alumbre más CpG1018 (1500 mcg1). La vacuna/placebo se administra en días 0 y 28 mediante inyección intramuscular (Taylor 2019b).

La vacuna VLP que se está produciendo tiene proteína S en la superficie de las VLP del HBsAg. La intención aquí es aprovechar que ya existen VLP de HBsAg en el mercado y que sabemos que son seguras y tienen un buen perfil en términos de inmunogenicidad (SpyBiotech and Serum Institute of India 2020).

3.4. Otros

El Consejo de Investigación Científica y Tecnológica de Turquía también está detrás del desarrollo de una vacuna contra la COVID-19. La vacuna turca se encuentra actualmente en la fase 1 de ensayos clínicos, donde se evaluará la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad.

El ensayo clínico se basa en la administración de la vacuna inyectada por vía subcutánea en dos dosis diferentes (3,75 µg o 15 µg) frente a un placebo. Los adyuvantes utilizados son alumbre y CpGODN-K3 (Estudio de un síndrome respiratorio agudo severo CoV-2, 2021).

Aunque aún no hay datos disponibles, el Prof. Dr. Hasan Mandal, presidente del Consejo de Investigación Científica y Tecnológica de Turquía, ya ha venido a garantizar que el objetivo es que la vacuna VLP esté disponible a finales de 2021 tras completar el proceso de las fases clínicas, y también que las vacunas pueden ser producidas por empresas turcas (Tubitak 2021).

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Cada vez más, las VLP, que son partículas que se asemejan a un virus sin contener material genético, se consideran una opción favorable para las formulaciones de vacunas. Los principales objetivos de las vacunas son la eficacia y la seguridad, y las vacunas VLP cumplen perfectamente estos requisitos. Además, estas vacunas, como hemos visto, ya han demostrado efectos muy prometedores en términos de activación del sistema inmunológico. Por ese motivo, se espera que las vacunas basadas en VLP ganen cada vez más espacio en el mercado.

Muchos sistemas de expresión ya han sido utilizados para la producción de VLPs, y cada uno muestra sus peculiaridades, por lo que se deben estudiar más a fondo, y

el sistema utilizado debe adaptarse a las VLPs a producir y a su finalidad. Todos ellos tienen ventajas y desventajas que deberíamos aprovechar al máximo.

Se espera que se sigan logrando muchos avances en la producción de VLP y seamos capaces de adaptar los sistemas continuamente y optimizarlos. También queremos creer que con el progreso podremos producir vacunas a costos cada vez más bajos, tanto en términos de producción de partículas como de costos de fábrica. A medida que la producción de vacunas se vuelve cada vez más inocua con la esperada llegada de las vacunas VLP al mercado, la producción de vacunas a bajo costo permitiría cada vez más a los países con menos recursos tener un mayor acceso a la vacunación.

Por supuesto, esta evolución de las vacunas, incluidas las vacunas VLP, se vio muy favorecida por la situación de la pandemia de COVID-19. Una situación de pandemia es, naturalmente, una situación en la que todo el mundo está en alerta, y casi instantáneamente se pide a la comunidad científica que produzca una vacuna que contenga rápidamente la situación de emergencia. Esto mismo ocurrió en la pandemia provocada por el SARS-CoV-2, virus que resultó ser altamente infeccioso y que causó millones de muertes en todo el mundo.

El hecho de que los investigadores hayan realizado experimentos previos con coronavirus como los virus MERS-CoV y SARS-CoV aumentó la velocidad con la que se han lanzado las vacunas al mercado. Ninguna de las vacunas para COVID-19 que ya están en el mercado se basa en VLP. Sin embargo, cinco vacunas VLP ya se encuentran en ensayos clínicos y los resultados que se conocen son alentadores.

Todo es todavía muy incierto, incluidos los resultados a largo plazo de las vacunas que ya se están administrando en todo el mundo, por lo que pueden ser necesarias nuevas inoculaciones, como es el caso de las vacunas contra el virus de la gripe, que se aplican una vez al año. Por lo tanto, es posible que todavía haya lugar en el mercado para las vacunas basadas en VLP contra el SARS-CoV-2.

Se espera cada vez más que las vacunas basadas en VLP marquen una diferencia, tanto en la lucha contra la pandemia que enfrentamos como en tantas otras enfermedades que seguimos y seguiremos teniendo que combatir.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), a través del Programa Operativo Regional Centro 2020, bajo el proyecto CENTRO-01-0145-FEDER-000008: BrainHealth 2020, y a través del COMPETE 2020 – Programa Operativo para la Competitividad y la Internacionalización y Fondos nacionales portugueses a través de FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia), en el marco de los proyectos POCI-01-0145-FEDER-030331 y UIDB/04539/2020 y UIDP/04539/2020 y una subvención de Gilead Sciences.

BIBLIOGRAFÍA

ABDELMASSIH, A.F., YE, J., KAMEL, A., MISHRIKY, F., ISMAIL, H.A., RAGAB, H.A. *et al.* (2020), A Multicenter Consensus: A Role of Furin in the Endothelial Tropism in Obese Patients with COVID-19 Infection. Obesity Medicine 2020: 100281.

ABRANCHES, R., MARCEL, S., ARCALIS, E., ALTMANN, F., FEVEREIRO, P. & STOGER, E. (2005), Plants as Bioreactors: A Comparative Study Suggests that Medicago Truncatula Is a Promising Production System. Journal of Biotechnology 120(1): 121-34.

ALZAMORA, M.C., PAREDES, T., CACERES, D., WEBB, C.M., VALDEZ, L.M., *et al.* (2020), Severe COVID-19 during Pregnancy and Possible Vertical Transmission. American Journal of Perinatology 37(8): 861-865.

BUFFIN, S., PEUBEZ, I., BARRIÈRE, F., NICOLAI, M.C., TAPIA, T., DHIR, V. *et al.* (2019), Influenza A and B Virus-Like Particles Produced in Mammalian Cells Are Highly Immunogenic and Induce Functional Antibodies. Vaccine 37(46): 6857-6867.

BURNETT, M.J.B. & BURNETT, A.C. (2020), Therapeutic Recombinant Protein Production in Plants: Challenges and Opportunities. Plants, People, Planet 2(2): 121-132.

CANTO, T. (2016), Transient Expression Systems in Plants: Potentialities and constraints. Advances in Experimental Medicine and Biology 896: 287-301.

CERVERA, L., GUTIÉRREZ-GRANADOS, S., MARTÍNEZ, M., BLANCO, J., GÒDIA, F. & SEGURA, M.M. (2013), Generation of HIV-1 Gag VLPs by Transient Transfection of HEK 293 Suspension Cell Cultures Using an Optimized Animal-Derived Component Free Medium. Journal of Biotechnology 166(4): 152-165.

CHAKRABORTY, C., SHARMA, A.R., SHARMA, G., BHATTACHARYA, M. & LEE, S.S. (2020), SARS-CoV-2 Causing Pneumonia-Associated Respiratory Disorder (COVID-19): Diagnostic and Proposed Therapeutic Options. European Review for Medical and Pharmacological Sciences 24(7): 4016-4026.

CHAMBERS, A.C., AKSULAR, M., GRAVES, L.P., IRONS, S.L., POSSEE, R.D. & KING, L.A. (2018), Overview of the Baculovirus Expression System. Current Protocols in Protein Science 91: 5.4.1-5.4.6.

CHICHESTER, J.A., GREEN, B.J., JONES, R.M., SHOJI, Y., MIURA, K., LONG, C.A. *et al.* (2018), Safety and Immunogenicity of a Plant-Produced Pfs25 Virus-Like

Particle as a Transmission Blocking Vaccine against Malaria: A Phase 1 Dose-Escalation Study in Healthy Adults. Vaccine 36(39): 5865-5871.

CIMICA, V. & GALARZA, J.M. (2017), Adjuvant Formulations for Virus-Like Particle (VLP) Based Vaccines. Clinical Immunology 183: 99-108.

COFFMAN, R.L., SHER, A. & SEDER, R.A. (2010), Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. Immunity 33(4): 492-503.

COMMITTEE FOR MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE (CHMP) Guideline on Adjuvants in Vaccines for Human Use, EMEA/CHMP/VEG/134716/2004.

COSTA, S., ALMEIDA, A., CASTRO, A. & DOMINGUES, L. (2014), Fusion Tags for Protein Solubility, Purification, and Immunogenicity in Escherichia Coli: The Novel Fh8 System. Frontiers in Microbiology 5: 63.

COVID-19 Programs; https://www.medicago.com/en/covid-19-programs/

COVID-19 Vaccine Tracker and Landscape; https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines

CRUZ, F.M., COLBERT, J.D., MERINO, E., KRIEGSMAN, B.A. & ROCK, K.L. (2017), The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. Annual Review of Immunology 35: 149-176.

CUBAS, R., ZHANG, S., KWON, S., SEVICK-MURACA, E.M., LI, M., CHEN, C. *et al.* (2009), Virus-Like Particle (VLP) Lymphatic Trafficking and Immune Response Generation after Immunization by Different Routes. Journal of Immunotherapy 32(2): 118-128.

CUICCHI, D., LAZZAROTTO, T. & POGGIOLI, G. (2021), Fecal-Oral Transmission of SARS-CoV-2: Review of Laboratory-Confirmed Virus in Gastrointestinal System. International Journal of Colorectal Diseases 36(3): 437-444.

DAI, S., ZHANG, Y., ZHANG, T., ZHANG, B., WANG, H. & DENG, F. (2018), Establishment of Baculovirus-Expressed VLPs Induced Syncytial Formation Assay for Flavivirus Antiviral Screening. Viruses 10(7): 1-19.

DENG, F., WANG, H. & DAI, S. (2018), Advances and Challenges in Enveloped Virus-Like Particle (VLP)-Based Vaccines. Journal of Immunological Sciences 2(2): 36-41.

EMA, N., AGENCY, T., STATES, M., AGENCY, T. & RISK, P. (2016), Committee A. HPV Vaccines : EMA Confirms Evidence Does Not Support that They Cause CRPS or POTS Reports after HPV Vaccination Consistent with What Would Be Expected in this Age Group. EMA/788882/2015.

EMBGENBROICH, M. & BURGDORF, S. (2018), Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. Frontiers in Immunology 9: 1643.

FELBERBAUM, R.S. (2015), The Baculovirus Expression Vector System: A Commercial Manufacturing Platform for Viral Vaccines and Gene Therapy Vectors. Biotechnology Journal 10(5): 702-714.

FISCHER, R., STOGER, E., SCHILLBERG, S., CHRISTOU, P. & TWYMAN, R.M. (2004), Plant-Based Production of Biopharmaceuticals. Current Opinion in Plant Biology 7(2): 152-158.

FLUCKIGER, A., ONTSOUKA, B., BOZIC, J., DIRESS, A., AHMED, T., BERTHOUD, T. *et al.* (2021) An Enveloped Virus-Like Particle Vaccine Expressing a Stabilized Prefusion Form of the SARS-CoV-2 Spike Protein Elicits Potent Immunity. Vaccine 39(35): 4988-5001.

FONTANA, D., KRATJE, R., ETCHEVERRIGARAY, M. & PRIETO, C. (2014), Rabies Virus-Like Particles Expressed in HEK293 Cells. Vaccine 32(24): 2799-2804.

FONTANA, D., KRATJE, R., ETCHEVERRIGARAY, M. & PRIETO, C. (2015), Immunogenic Virus-Like Particles Continuously Expressed in Mammalian Cells as a Veterinary Rabies Vaccine Candidate. Vaccine 33(35): 4238-4246.

FUENMAYOR, J., GODIA, F. & CERVERA, L. (2017), Production of Virus-Like Particles for Vaccines. New Biotechnology 39 (Pt B): 174-180.

GARRONE, P., FLUCKIGER, A.C., MANGEOT, P.E., GAUTHIER, E., DUPEYROT-LACAS, P., MANCIP, J. *et al.* (2011), A Prime-Boost Strategy Using Virus-Like Particles Pseudotyped for HCV Proteins Triggers Broadly Neutralizing Antibodies in Macaques. Science Translational Medicine 3(94): 94ra71.

GOBEIL, P., PILLET, S., SÉGUIN, A., BOULAY, I., MAHMOOD, A., VINH, D.C. *et al.* (2021), Interim Report of a Phase 2 Randomized Trial of a Plant-Produced Virus-Like Particle Vaccine for COVID-19 in Healthy Adults Aged 18-64 and Older Adults Aged 65 and Older. medRxiv 2021.05.14.21257248.

GOMES, C.P., FERNANDES D.E., CASIMIRO, F., MATA, G.F., PASSOS, M.T., VARELA, P. *et al.* (2020), Cathepsin L in COVID-19: From Pharmacological Evidences to Genetics. Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology 10: 589.

GOMORD, V. & FAYE, L. (2004), Posttranslational Modification of Therapeutic Proteins in Plants. Current Opinion in Plant Biology 7(2): 171-181.

GRGACIC, E.V.L. & ANDERSON, D.A. (2006), Virus-Like Particles: Passport to Immune Recognition. Methods 40(1): 60-65.

GROUP HEVW (2014), Hepatitis E Vaccine : Composition, Safety, Immunogenicity and Efficacy. A Document Prepared for Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) by the Hepatitis E Vaccine Working Group [Internet], 30 pp.; http://www.innovax.cn/en/pro1.aspx?CateID=52#103

HARRISON, A.G., LIN, T. & WANG, P. (2020), Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends in Immunology 41(12): 1100-1115.

HINDSON, J. (2020), COVID-19: Faecal-Oral Transmission? Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 17: 259.

HO, Y., LIB, P.H., LIU, C.Y.Y., LEE, S.P. & CHAO, Y.C. (2004), Assembly of Human Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Like Particles. Biochemical and Biophysical Research Communications 318(4): 833-838.

HOFFMANN, M., KLEINE-WEBER, H., SCHROEDER, S., KRUGER, N., HERRLER, T., ERICHSEN, S. *et al.* (2020), SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell 181(2): 271-280.e8.

HU, M., LIN, H., WANG, J., XU, C., TATEM, A.J., MENG, B. *et al.* (2021), Risk of Coronavirus Disease 2019 Transmission in Train Passengers: An Epidemiological and Modeling Study. Clinical Infectious Diseases 72(4): 604-610.

HUANG, X., WANG, X., ZHANG, J., XIA, N. & ZHAO, Q. (2017), Escherichia Coli-Derived Virus-Like Particles in Vaccine Development. npj Vaccines 2: 3.

JAIN, N.K., SAHNI, N., KUMRU, O.S., JOSHI, S.B., VOLKIN, D.B. & RUSSELL MIDDAUGH, C. (2015), Formulation and Stabilization of Recombinant Protein Based Virus-Like Particle Vaccines. Adv Drug Deliv Rev 93: 42-55.

JANITZEK, C.M., MATONDO, S., THRANE, S., NIELSEN, M.A., KAVISHE, R., MWAKALINGA, S.B. *et al.* (2016), Bacterial Superglue Generates a Full-Length Circumsporozoite Protein Virus-Like Particle Vaccine Capable of Inducing High and Durable Antibody Responses. Malaria Journal 15(1): 1-9.

JOHNSON, B.A., XIE, X., KALVERAM, B., LOKUGAMAGE, K.G., MURUATO, A., ZOU, J. *et al.* (2020), Furin Cleavage Site Is Key to SARS-CoV-2 Pathogenesis. bioRxiv Prepr Serv Biol 2020.08.26.268854.

KADAM, S.B., SUKHRAMANI, G.S., BISHNOI, P., PABLE, A.A. & BARVKAR, V.T. (2021), SARS-CoV-2, the Pandemic Coronavirus: Molecular and Structural Insights. Journal of Basic Microbiology 61: 180-202.

KIM, H.J. & KIM, H.J. (2016), Yeast as an Expression System for Producing Virus-Like Particles: What Factors Do We Need to Consider? Letters in Applied Microbiology 64(2): 1-33.

KONDA, M., DODDA, B., KONALA, V.M., NARAMALA, S. & ADAPA, S. (2020), Potential Zoonotic Origins of SARS-CoV-2 and Insights for Preventing Future Pandemics through One Health Approach. Cureus 12(6): e8932.

LEE, S.H., CHU, K.B., KANG, H.J. & QUAN, F.S. (2019), Virus-Like Particles Containing Multiple Antigenic Proteins of Toxoplasma Gondii Induce Memory T Cell and B Cell Responses. PLoS One 14(8): 1-15.

LEDNICKY, J.A., LAUZARD, M., FAN, Z.H., JUTLA, A., TILLY, T.B., GANGWAR, M. *et al.* (2020), Viable SARS-CoV-2 in the Air of a Hospital Room with COVID-19 Patients. International Journal of Infectious Diseases 100: 476-482.

LI, G., FAN, Y., LAI, Y., HAN, T., LI, Z., ZHOU, P. *et al.* (2020), Coronavirus Infections and Immune Responses. Journal of Medical Virology 92(4): 424-432.

LI, Y., ZHAO, R., ZHENG, S., CHEN, X., WANG, J., SHENG, X. *et al.* (2020), Lack of Vertical Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, China. Emerging Infectious Diseases 26(6): 1335-1336.

LIU, F., WU, X., LI, L., LIU, Z. & WANG, Z. (2013), Use of Baculovirus Expression System for Generation of Virus-Like Particles: Successes and Challenges. Protein Expression and Purification 90(2): 104-116.

Medicago Announces Positive Phase 1 Results for Its COVID-19 Vaccine Candidate; https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-announces-positive-phase-1-results-for-its-covid-19-vaccine-candidate/

Medicago e GSK anunciam resultados provisórios positivos de Fase 2 para vacina candidata COVID-19 com adjuvante; https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-and-gsk-announce-positive-interim-phase-2-results-for-adjuvanted-covid-19-vaccine-candidate/

Medicago Announces Production of a Viable Vaccine Candidate for COVID-19; https://www.medicago.com/en/media-room/medicago-announces-production-of-a-viable-vaccine-candidate-for-covid-19/

METZ, S.W., GARDNER, J., GEERTSEMA, C., LE, T.T., GOH, L., VLAK, J.M. *et al.* (2013), Effective Chikungunya Virus-Like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. PLoS Neglected Tropical Diseases 7(3): e2124.

MEYEROWITZ, E.A., RICHTERMAN, A., GANDHI, R.T. & S.A.X., P.E. (2021), Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. Annales of Internal Medicine 174(1): 69-79.

MOHSEN, M.O., GOMES, A.C., VOGEL, M. & BACHMANN, M.F. (2018), Interaction of Viral Capsid-Derived Virus-Like Particles (VLPs) with the Innate Immune System. Vaccines 6(3): 1-12.

NORDIC A/S, B. (2021) (OMX: BAVA, OTC: BVNRY). Bavarian Nordic Reports Encouraging Preclinical Data for COVID-19 Vaccine Candidate Ahead of First-in-Human Trial. 2021; https://www.globenewswire.com/news-release/2021/03/08/2188309/0/en/Bavarian-Nordic-Reports-Encouraging-Preclinical-Data-for-COVID-19-Vaccine-Candidate-Ahead-of-First-in-Human-Trial.html

OISSON, S.E., VILLA, L.L., COSTA, R.L.R., PETTA, C.A., ANDRADE, R.P., MALM, C. *et al.* (2007), Induction of Immune Memory Following Administration of a Prophylactic Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV) Types 6/11/16/18 L1 Virus-Like Particle (VLP) vaccine. Vaccines 25(26): 4931-4939.

Our Pipeline: A Broad Spectrum of Vaccines & Immunotherapeutics | VBI Vaccines Inc. [Internet] [cited 2021 May 4]. Available from: https://www.vbivaccines.com/our-pipeline/#prophylactic

PASTORINO, B., TOURET, F., GILLES, M., DE LAMBALLERIE, X. & CHARREL, R.N. (2020), Prolonged Infectivity of SARS-CoV-2 in Fomites. Emerging Infectious Diseases 26(9): 2256-2257.

PILLET, S., COUILLARD, J., TRÉPANIER, S., POULIN, J.F., YASSINE-DIAB, B., GUY, B. *et al.* (2019), Immunogenicity and Safety of a Quadrivalent Plant-Derived Virus Like Particle Influenza Vaccine Candidate – Two Randomized Phase II Clinical Trials in 18 to 49 and 50 Years Old Adults. PLoS One 14(6): e0216533.

POMPLUN, S. (2021) Targeting the SARS-CoV-2-Spike Protein: From Antibodies to Miniproteins and Peptides. RSC Medicinal Chemistry 12(2): 197-202.

ROLDÃO, A., MELLADO, M.C.M., CASTILHO, L.R., CARRONDO, M.J. & ALVES P.M. (2010), Virus-Like Particles in Vaccine Development. Expert Review Vaccines 9(10): 1149-1176.

ROSSI, G.A., SACCO, O., MANCINO, E., CRISTIANI L. & MIDULLA F. (2020), Differences and Similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: Spike Receptor-Binding Domain Recognition and Host Cell Infection with Support of Cellular Serine Proteases. Infection 48(5): 665-669.

Safety, Tolerability, and Immunogenicity of the COVID-19 Vaccine Candidate (VBI-2902a). https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04773665

Safety and Tolerability of COVID-19 Vaccine (ABN-CoV2) – Full Text View – ClinicalTrials.gov [Internet] [cited 2021 May 11]. Available from: https://clinicaltrials. gov/ct2/show/study/NCT04839146

SANTARPIA, J.L., HERRERA, V.L., RIVERA, D.N., RATNESAR-SHUMATE, S., REID S.P., DENTON, P.W. *et al.* (2020) The Infectious Nature of Patient-Generated SARS-CoV-2 Aerosol. medRxiv. https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.07.13.20041632v2

SCOTTI, N. & RYBICKI, E.P. (2013), Virus-Like Particles Produced in Plants as Potential Vaccines. Expert Rev Vaccines. 12(2): 211-224.

SEIFERT, M. & KUPPERS, R. (2016), Human Memory B Cells. Leukemia 30(12): 2283-2292.

SHANMUGARAJ, B., MALLA, A. & PHOOLCHAROEN, W. (2020), Emergence of Novel Coronavirus 2019-nCoV: Need for Rapid Vaccine and Biologics Development. Pathogens 9(2): 1-10.

SEREEN, M.A., KHAN, S., KAZMI, A., BASHIR, N. & SIDDIQUE, R. (2020), COVID-19 infection: Origin, Transmission, and Characteristics of Human Coronaviruses. Journal of Advanced Research 24: 91-98.

SOKOLENKO, S., GEORGE, S., WAGNER, A., TULADHAR, A., ANDRICH, J.M.S. & AUCOIN, M.G. (2012), Co-Expression vs. Co-Infection Using Baculovirus Expression Vectors in Insect Cell Culture: Benefits and Drawbacks. Biotechnology Advances 30(3): 766-781.

STORNI, T. & BACHMANN, M.F. (2004), Loading of MHC Class I and II Presentation Pathways by Exogenous Antigens: A Quantitative In Vivo Comparison. Journal of Immunology 172(10): 6129-6135.

Study of a Recombinant Coronavirus-Like Particle COVID-19 Vaccine in Adults; https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04636697?term=medicago&cond=covid-19&draw=2&rank=1

SpyBiotech and Serum Institute of India Announce that the First Subjects Have Been Dosed in a Phase I/II Trial of a Novel Virus-Like Particle Vaccine Targeting COVID-19; https://www.spybiotech.com/news/-/

Study of a Severe Acute Respiratory Syndrome CoV-2 (SARS-CoV-2) Virus-Like Particle (VLP) Vaccine in Healthy Adults – 2021; https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04818281?cond=NCT04818281&draw=2&rank=1

TAN, M. & JIANG, X. (2014), Subviral Particle as Vaccine and Vaccine Platform. Current Opinion in Virology 6(1): 24-33.

TAN, T.K., RIJAL, P., RAHIKAINEN, R., KEEBLE, A.H., SCHIMANSKI, L., HUSSAIN, S. *et al.* (2021), A COVID-19 Vaccine Candidate Using SpyCatcher Multimerization of the SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain Induces Potent Neutralising Antibody Responses. Nature Communications 12(1): 1-40.

TAYLOR, N., ANZCTR (2019) – Registration [Internet]. Australia New Zealand Clinical Trial Registry; https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/Trial. https://anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?id=380145&is Review=true

TAYLOR, N., ANZCTR – Australia New Zealand Clinical Trial Registry. 2019; https://www.anzctr.org.au/Trial/Registration/Trial; https://anzctr.org.au/Trial/Registration/TrialReview.aspx?ACTRN=12620001308987

TECHNOLOGY; https://www.spybiotech.com/technology

THE VACCINE – Radboudumc; https://www.radboudumc.nl/en/trials/coronavirus-vaccine-research/the-vaccine

THRANE, S., JANITZEK, C.M., MATONDO, S., RESENDE, M., GUSTAVSSON, T., JONGH, W.A. *et al.*

(2016), Bacterial Superglue Enables Easy Development of Efficient Virus-Like Particle Based Vaccines. J Nanobiotechnology 14(1): 1-16.

TRENDS, S. (2020), Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. 2020.

TUBITAK (2021) Presidente Prof. Dr. Hasan Mandal Faz Avaliações de Estudos de Vacinas e Medicamentos COVID-19 | INSTITUIÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA TURQUIA [Internet]. 2021 [cited 2021 Jun 8]. Available from: https://www.tubitak.gov.tr/tr/haber/tubitak-baskani-prof-dr-hasan-mandal-covid-19-asi-ve-ilac-calismalariyla-ilgili-degerlendirmelerde

VBI Vaccines Inc/bc 2020 Current Report 8-K [Internet]. 2020 [cited 2021 May 8]. Available from: https://sec.report/Document/0001493152-20-016722/

VBI Vaccines Announces Initial Positive Phase 1 Data for its eVLP Vaccine Candidate against COVID-19 | VBI Vaccines [Internet] [cited 2021 Sep 5]. Available from: https://www.vbivaccines.com/press-releases/covid-19-vaccine-phase-1-data/

VLP Technologies and Production Platform [Internet] [cited 2021 Apr 18]. Available from: https://www.medicago.com/en/technologies/

WANG, W., XU, Y., GAO, R., LU, R., HAN, K., WU, G. *et al.*(2020), Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA – J Am Med Assoc [Internet]. 323(18): 1843-1844. Available from: https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/276299

WANG, M.Y., ZHAO, R., GAO, L.J., GAO, X.F., WANG, D.P. & CAO, J.M. (2020), SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. Front Cell Infect Microbiol. 10(November): 1-17.

WARD, B.J., GOBEIL, P., SÉGUIN, A., ATKINS, J., BOULAY, I., CHARBONNEAU, P.-Y. *et al.* (2020), Phase 1 trial of a Candidate Recombinant Virus-Like Particle Vaccine for COVID-19 Disease Produced in Plants. medRxiv; https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.04.20226282v1

WEINBERGER, B. (2018), Adjuvant Strategies to Improve Vaccination of the Elderly Population. Current Opinion in Pharmacology 41: 34-41.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data; https://covid19.who.int/

WHO (2020), Director-General's Opening Remarks at the Media Briefing on COVID-19 – 11 March 2020; https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020?fbclid=IwAR0-6J0d70at8muH_rAHOkhhRo0c9xEAThdv-gEnL-PkNFUww9AjvPULFzmA

ZELTINS, A. (2013), Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. Molecular Biotechnology 53(1): 92-107.

ZHANG, B., LIU, S., DONG, Y., ZHANG, L., ZHONG, Q., ZOU, Y. *et al.* (2020), Positive Rectal Swabs in Young Patients Recovered from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Journal of Infection 81(2): e49-52.

ZHU, H., WANG, L., FANG, C., PENG, S., ZHANG, L., CHANG, G. *et al.*(2020), Clinical Analysis of 10 Neonates Born to Mothers with 2019-nCoV Pneumonia. Translational Pediatry 2020; 9(1): 51-60.

Capítulo XXVI
Vacunas frente a la COVID-19

María Jiménez Valera y Alfonso Ruiz-Bravo López*
Departamento de Microbiología, Universidad de Granada
** Académico de número de la Academia Iberoamericana de Farmacia*

INTRODUCCIÓN

El coronavirus designado como SARS-CoV-2 (siglas de «*severe acute respiratory síndrome related coronavirus 2*»), responsable del cuadro clínico conocido como COVID-19 («*Coronavirus Disease 2019*»), apareció como un agente patógeno emergente en la localidad china de Wuhan, en diciembre de 2019 (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2020). Una selección de los sucesivos comunicados de la OMS (https://www.who.int/es/news/item/29-06-2020-covidtimeline) da una idea de cómo la situación se agravaba en los primeros meses después de reconocido el brote, sin que se dispusiese de otros medios que las barreras epidemiológicas para intentar frenar la expansión del virus: en los días 11 y 12 de febrero de 2020, la OMS convoca un Foro mundial que examina diversos aspectos del nuevo virus, incluyendo entre otros su transmisión, diagnóstico, epidemiología, manejo clínico y las posibilidades de investigación y desarrollo de vacunas; el 24 del mismo mes, la Misión Conjunta OMS-China sobre la COVID-19 expone que «para reducir la enfermedad y mortalidad ligadas a la COVID-19, la planificación de la preparación a corto plazo debe incluir la aplicación a gran escala de medidas de salud pública no farmacológicas», es decir, se insiste en las barreras epidemiológicas como la detección y aislamiento de casos, el rastreo y seguimiento de contactos y su puesta en cuarentena, apelando siempre a la colaboración comunitaria; cinco días después se publican indicaciones sobre las personas que deberían someterse a cuarentena y las condiciones mínimas para que la cuarentena sea efectiva; el 6 de marzo la OMS publica su «Hoja de ruta de la investigación mundial contra el nuevo coronavirus», que entre sus prioridades de investigación incluye, como objetivo a largo plazo, el desarrollo de vacunas; el 11 de marzo se hace la declaración de la pandemia; el 11 de abril se presenta un borrador con una evaluación preliminar de las vacunas candidatas, que en ese momento ya son 70, de ellas tres en evaluación clínica (una en fase II, las otras dos en fase I) y 67 en evaluación preclínica; se incluían vacunas RNA, DNA, con vector viral, de virus atenuado, de virus entero inactivado y vacunas subunidad. La primera vacuna en ser validada por la OMS fue Comirnaty, una vacuna de mRNA elaborada por Pfizer/BioNTech (31 de diciembre de 2020). El 26 de enero de 2021, la OMS contemplaba un total de 236 vacunas frente a la COVID-19, de las que 63 estaban en fase de desarrollo clínico y 173 en evaluación preclínica. La última actualización disponible en el rastreador de la OMS (con fecha de 30 de marzo de 2023) elevaba estas cifras a 183 vacunas en desarrollo clínico y 199 en investigación preclínica, para un total de 382 vacunas candidatas (https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

¿Por qué era urgente disponer de vacunas frente a la COVID-19?

Si se exceptúa a los anticuerpos monoclonales de uso terapéutico, no se ha dispuesto de agentes antivirales específicos efectivos frente al SARS-CoV-2 hasta muy recientemente, con la introducción de moléculas como el molnupiravir (Lagevrio), que actúa a nivel de una enzima vírica, la RNA-polimerasa dependiente de RNA,

induciendo una «catástrofe» mutacional que impide la correcta replicación del virus; y el nirmatrelvir (Paxlovid), que inhibe a la proteasa principal del virus, Mpro, ubicada en la proteína no estructural Nsp5 (Owen *et al.* 2021; Painter *et al.* 2021; Ullrich *et al.* 2022). El tratamiento de los casos graves de COVID-19 se dirige al soporte respiratorio sintomático en caso de necesidad, la terapia anti-inflamatoria (incluyendo anticuerpos monoclonales neutralizantes de citocinas proinflamatorias) para combatir la «tormenta de citocinas» y los intentos para reducir la carga viral, para lo cual se han venido usando algunos agentes antivirales conocidos (remdesivir) y otros fármacos como la hidroxicloroquina y la ivermectina que, sin tener la acción antiviral como indicación primaria, han demostrado cierta capacidad para limitar la proliferación del SARS-CoV-2 (Cantini *et al.* 2020; Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2020). La aplicación exitosa de los anticuerpos monoclonales en la terapia de otras infecciones virales impulsó la investigación de su posible utilidad para el tratamiento de la COVID-19; así, se desarrollaron numerosos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína S (la proteína trimérica de espiga o pico –«*spike*»– que se une al receptor celular ACE2 para iniciar la infección), los cuales son capaces de neutralizar al SARS-CoV-2 en ensayos *in vitro*; y en diciembre de 2021 había ya 25 anticuerpos monoclonales en ensayos clínicos (Hwang *et al.* 2022). Pero el uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales neutralizantes del virus tiene dos inconvenientes: en primer lugar, para que sean efectivos deben administrarse en la fase temprana de la enfermedad; y además, la aparición de variantes con mutaciones que afectan a la proteína S constituye un mecanismo de evasión del virus que limita la eficacia de muchos anticuerpos monoclonales (Hwang *et al.* 2022). Si a todo ello se añade la rapidez de transmisión de la infección por SARS-CoV-2, se comprende que desde el inicio de la pandemia se pusiese de manifiesto la necesidad de contar con vacunas eficaces que permitieran una cobertura de inmunización a escala mundial (Li *et al.* 2020; Cavaleri *et al.* 2021; Alshrari *et al.* 2022), con una urgencia mucho mayor de la que se había planteado años antes como consecuencia de los brotes de los otros dos coronavirus humanos causantes de patología pulmonar grave, el SARS-CoV y el MERS-CoV (Graham *et al.* 2013).

El desarrollo de una nueva vacuna era un proceso lento

Razonablemente, la posibilidad de disponer de vacunas eficaces frente a la COVID-19 hubiera debido parecer remota, dado el largo período de tiempo que se necesita para desarrollar y llevar al mercado una vacuna nueva. El desarrollo de una vacuna no difiere del de otros fármacos, cuyas etapas han sido descritas sumariamente por la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios), como sigue (https://www.aemps.gob.es/la-aemps/ultima-informacion-de-la-aemps-acerca-del-covid%E2%80%9119/vacunas-contra-la-covid%E2%80%9119/desarrollo-de-vacunas/):

- Fase preclínica, que incluye la investigación *in vitro* y los estudios en animales.
- Ensayos clínicos de fase I, para obtener una primera evaluación de la seguridad en humanos.
- Ensayos clínicos de fase II, que comprueban el correcto funcionamiento del fármaco y permiten consolidar los protocolos de administración (dosis, pautas).
- Ensayos clínicos de fase III, donde, en número mayor de individuos, se verifican la eficacia y seguridad del fármaco.
- Una vez autorizado y comercializado el fármaco, se prosigue el seguimiento de sus efectos y seguridad, en lo que constituye la fase IV.

En el caso del desarrollo de una vacuna, la etapa preclínica comprende la investigación básica de laboratorio encaminada a identificar los antígenos a utilizar y la forma farmacéutica más adecuada; posteriormente, los ensayos *in vitro* y en animales de experimentación que establecen la capacidad inmunógena de la vacuna y su seguridad (ausencia de efectos colaterales graves), requisito para entrar en los ensayos clínicos. En la fase I, la administración de la vacuna a un grupo reducido de individuos permite corroborar la seguridad de la vacuna y determinar el tipo y el alcance de la respuesta inmunológica que induce. En la fase II, los datos obtenidos de grupos numerosos (varios centenares de personas), con inclusión de grupos placebo, sirven para correlacionar la inmunogenicidad y las dosis y pautas de vacunación propuestas, continuando siempre con la evaluación de la seguridad. Finalmente, las vacunas candidatas que superan la fase II pasan a la fase III, donde grupos de mayor tamaño (de miles a decenas de miles de personas elegidas de manera aleatoria para administración de vacuna o de placebo y organizados en doble ciego) permiten la evaluación de efectos adversos infrecuentes y de la eficacia en cuanto a la capacidad para prevenir la infección o proteger frente a la enfermedad. Añadiendo el tiempo consumido por los trámites de aprobación hasta la autorización final para la comercialización, se estima que el tiempo total desde el inicio es de unos 10 años, aunque una aceleración razonable de estos procesos podría reducirlo a seis o siete años (Papaneri *et al.* 2015).

Las vacunas frente a la COVID-19 han estado disponibles en un tiempo asombrosamente corto

Sin embargo, el desarrollo de las vacunas frente a la COVID-19 ha ocurrido con una velocidad sin precedentes. En el Instituto Jenner, ligado al Departamento Nuffield de Medicina de la Universidad de Oxford desde 2005, se había puesto a punto una tecnología que utilizaba adenovirus de chimpancé como vectores para introducir en células de mamífero genes de antígenos seleccionados por su capacidad para inducir inmunidad protectora frente a patógenos; esta tecnología se había utilizado para elaborar formulaciones candidatas a vacunas frente al MERS, cuyo brote epidémico apareció en Arabia Saudí en 2012 (Alharbi *et al.* 2017). Investigadores del Instituto Jenner comenzaron a trabajar en la aplicación de esta misma tecnología al diseño de una vacuna frente a la COVID-19 en enero de 2020, justo cuando se acababa de depositar en GenBank la primera secuencia completa del genoma del SARS-CoV-2 por Wu *et al.* (2020), y este proyecto del Instituto inglés fue el primero de que se tiene noticia de los muchos que luego seguirían en la búsqueda de las ansiadas vacunas; culminaría, un año después, con la vacuna Vaxzevria de Oxford/AstraZeneca. La primera solicitud de patente para una vacuna frente a la COVID-19 fue presentada por el Instituto de Medicina Militar de la Academia China de Ciencias Militares junto con CanSinoBIO el 18 de marzo de 2020 y publicada el 2 de junio por la Administración Nacional de Propiedad Intelectual de China; se trataba de la vacuna Ad5-nCOV, también vectorizada por adenovirus, cuyo ensayo clínico en fase I fue publicado el 13 junio de 2020 (Zhu *et al.* 2020b) y fue autorizada el 25 de ese mismo mes para su uso restringido en militares. En septiembre de 2020 se publicó el ensayo en fase I de la vacuna Sputnik V (Gam-COVID-Vac) del Centro de Investigación Gamaleya (Logunov *et al.* 2020), igualmente vectorizada por adenovirus; fue autorizada en Rusia el 11 de agosto de ese mismo año para su uso de emergencia, recibiendo la aprobación permanente total del Ministerio de Salud de Rusia el 4 de febrero de 2022. La primer vacuna frente a la COVID-19 en recibir la autorización provisional en Europa y Estados Unidos fue la vacuna RNA de Pfizer-BioNTech, denominada inicialmente BNT162b2 y comercializada actualmente como Comirnaty; los primeros ensayos clínicos de esta vacuna se publicaron en agosto del 2020, en un *preprint* que fue actualizado como publicación definitiva electrónica en octubre (Walsh *et al.* 2020); la autorización de emergencia por la Federal Drug Administration (FDA) fue el 11 de diciembre de 2020, y por la European Medicines Agency (EMA) el 21 de diciembre del mismo año; ha sido la primera vacuna de la COVID-19 aprobada por la FDA (23 de agosto de 2021).

Por tanto, las primeras vacunas frente a la COVID-19 estuvieron disponibles en un plazo de seis meses a un año desde el inicio del brote en Wuhan y de tres a nueve meses desde la declaración de la pandemia por la OMS, en lo que ha sido calificado como uno de los avances más rápidos en la moderna historia de la biomedicina. Hay varios factores que han influido en esta rapidez de respuesta a la pandemia. A los avances en biotecnología, que han permitido disponer de plataformas rápidas y eficaces de producción de vacunas (Alshrari *et al.* 2022), se han sumado los conocimientos en virología, genómica e interacciones patógeno-hospedador, que han venido proporcionando nuevas herramientas a la vacunología (Nabel *et al.* 2013). Impulsados por la urgencia de encontrar formas de enfrentarse a la pandemia COVID-19, los centros de investigación y las compañías farmacéuticas incrementaron sus colaboraciones (Alshrari *et al.* 2022); las autoridades sanitarias de los distintos países se esforzaron en abreviar los trámites burocráticos y acortar los plazos de concesión de licencias, y los ensayos clínicos se aceleraron sin perjuicio de los requisitos de seguridad y eficacia Alshrari *et al.* 2022). Pero sin duda un factor decisivo fue la existencia de una importante investigación previa sobre le generación de vacunas frente al SARS («*Severe Acute Respiratory Syndrome*») y el MERS («*Middle East Respiratory Syndrome*»).

Lo que nos enseñaron los brotes del SARS y del MERS

El brote de SARS se inició en Foshan, perteneciente a la provincia china de Guangdong, en noviembre de 2002 (Barth *et al.* 2021) y se extendió como una epidemia que en pocos meses afectó a 29 países (Li *et al.* 2020) y llegó a considerarse una amenaza global, pero que afortunadamente pudo ser contenido, lo que llevó a la OMS a informar el 5 de julio de 2003 la desaparición de las cadenas de transmisión entre humanos (https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/health-topics/who-cds-csr-aro-2004-18fcdaab9-a1ca-42f7-adaf-d5c624b54b76.pdf?sfvrsn=949080c3_1&download=true), aunque en meses posteriores aún se registraron algunos pequeños brotes asociados a fallos de seguridad en laboratorios que trabajaban con el virus (https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2004_05_18a-en). El balance de esta epidemia fue de 8.096 casos confirmados y 774 muertes, lo que corresponde a una letalidad de casi 9,6 % (https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003). El primer caso de MERS se registró en Jeddah, Arabia Saudita, en junio de 2012 (Barth *et al.* 2021) y en años posteriores se detectaron casos en 27 países (Li *et al.* 2020); el balance

en octubre de 2023 es de un total de 2.608 casos confirmados, de los que 938 fallecieron, lo que se traduce en una letalidad del 36% (http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html). Como acertadamente señalan Costanzo *et al.* (2022), los coronavirus humanos conocidos hasta 2002 eran agentes causales de infecciones respiratorias leves incluidas en la entidad nosológica designada como «resfriado común», pero las sucesivas irrupciones del SARS-CoV y del MERS-CoV pusieron de manifiesto la necesidad de contar con medios de inmunoprofilaxis. La investigación sobre vacunas frente al SARS produjo resultados interesantes, pero finalmente decayó, ya que la epidemia desapareció, como se ha comentado, a mediados de 2003; en el caso del MERS, la restricción geográfica de su incidencia también contribuyó a limitar los esfuerzos por desarrollar vacunas (Costanzo *et al.* 2022). Sin embargo, se diseñaron posibles vacunas de todos los tipos conocidos: virus enteros inactivados, virus atenuados, vacunas subunidad, genes insertados en vectores virales y vacunas DNA (Graham *et al.* 2013).

Estos estudios aportaron una base de trabajo ya realizado que fue aprovechado para el desarrollo de vacunas frente a la COVID-19. Ante todo, dejaron claro que la proteína S es un antígeno capaz de inducir inmunidad protectora (ver el concepto de «antígeno protector» en la sección 1.2): en la infección natural, la proteína S es un antígeno inmunodominante que protagoniza la respuesta de anticuerpos (Barth *et al.* 2021) y muchas vacunas basadas en proteína S del SARS-CoV y del MERS-CoV provocaron potentes respuestas de anticuerpos neutralizantes y mostraron efectos protectores en modelos preclínicos (Li *et al.* 2020). También se llamó la atención sobre posibles respuestas indeseables: con una masa de 141 KDa (https://covid-19.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC2), esta proteína contiene numerosos epítopos que inducen una diversidad de anticuerpos, de los cuales los dirigidos contra el dominio de unión al receptor (RBD, de «*receptor-binding domain*»), que contiene la secuencia de aminoácidos por la que S se une al receptor celular ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2), son capaces de neutralizar la infecciosidad del virus; el resto de anticuerpos anti-S, no neutralizantes, pueden incluso ser perjudiciales. Este es el caso de los llamados «anticuerpos facilitadores de la infección» que por su parte específica se unen al virus y por la inespecífica se unen a receptores (FcγR de «*Fc gamma receptor*», receptores para la parte Fc de la inmunoglobulina G) presentes en la superficie de células como monocitos/macrófagos y células dendríticas, que al carecer de ACE2 no se infectarían normalmente por los virus que, como el SARS-CoV y el SARS-CoV-2, usan este receptor celular, pero que internalizarán a estos virus si están recubiertos por tales anticuerpos (Enjuanes *et al.* 2016). Para evitar este efecto adverso se propuso diseñar vacunas que no contuviesen la proteína S entera, sino solo el RBD, que inducen títulos altos de anticuerpos neutralizantes pero no contienen epítopos adicionales que induzcan anticuerpos no neutralizantes potencialmente facilitadores de la infección (Enjuanes *et al.* 2016; Li *et al.* 2020). Sin embargo, el fenómeno de facilitación de la infección por anticuerpos parece infrecuente *in vivo* y no se ha descrito en el SARS ni el MERS (Sette y Crotty 2021); como se verá a lo largo de las secciones del apartado 3, la presencia de la proteína S completa en las vacunas frente a la COVID-19 no ha planteado inconvenientes en este sentido.

Otro antígeno en el que fijaron su atención los investigadores fue la proteína N, constituyente de la nucleocápsida. Dado que la proteína N no aparece en la superficie de los viriones ni interviene en la unión a receptores celulares, la inmunización con ella no induce anticuerpos neutralizantes, pero si induce inmunidad celular (mediada por linfocitos T) y tiene la ventaja de estar más conservada (presenta muchas menos variaciones) que la proteína S, lo que la convierte en un objetivo potencial para una vacuna universal frente a los coronavirus patógenos del ser humano (Li *et al.* 2020) (ver sección 3.11.5).

Los estudios sobre vacunas con virus enteros inactivados frente al SARS y el MERS también revelaron un posible efecto adverso, debido a una respuesta inmunitaria sesgada hacia la participación de células Th (células T «*helper*» o cooperadoras, identificables por su marcador CD4) pertenecientes a la subpoblación Th2. Las células Th2 están implicadas en respuestas de hipersensibilidad que cursan con infiltración tisular de eosinófilos (Iwasaki *et al.* 2021). Se ha descrito que animales que recibieron vacunas frente a SARS y frente a MERS confeccionadas virus enteros inactivados presentaron una inmunopatología pulmonar con eosinofilia tras el desafío con los correspondientes virus, lo que se ha interpretado como una reacción de hipersensibilidad mediada por la respuesta de células Th2 a alguno de los antígenos presentes en las vacunas, que tal vez podría prevenirse incorporando a las vacunas adyuvantes inmunomoduladores que impidan el sesgo hacia la respuesta Th2 (Li *et al.* 2020). Todos estos hallazgos han debido tenerse en cuenta a la hora de desarrollar vacunas frente a la COVID-19.

En las páginas que siguen se exponen algunas consideraciones generales sobre vacunas, para a continuación presentar los aspectos más relevantes del estado actual del desarrollo de vacunas frente a la COVID-19. Hay que considerar que este es un campo en rapidísima evolución, y que cuando un estudio de estas características ve la luz ya se habrán producido nuevas aportaciones

importantes, que seguirán abriendo camino hacia la inmunoprevención de esta y otras posibles pandemias.

1. ¿CÓMO SE HACEN LAS VACUNAS?

1.1. Inmunidad frente a infecciones

El Diccionario de Términos Médicos de la Real Academia Nacional de Medicina de España define el término «Infección» como la «entrada, implantación y multiplicación de un microbio patógeno en el organismo, con estimulación posterior del sistema inmunitario, aunque no siempre produzca enfermedad», ya que, en efecto, existen infecciones subclínicas e infecciones latentes, que no se acompañan de sintomatología (https://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL_BUS=3&LEMA_BUS=infecci%C3%B3n).

Para causar una infección, el microorganismo patógeno debe atravesar las barreras mecánicas constituidas por piel y mucosas y acceder al medio interno, donde entrará en contacto con los diversos mecanismos defensivos del sistema inmune. Estos mecanismos se agrupan en no específicos, pertenecientes a la inmunidad innata, y específicos, propios de la inmunidad adaptativa; conviene resaltar que, a pesar de sus diferencias, ambos tipos de inmunidad no actúan de forma independiente, sino que mantienen múltiples conexiones (Iwasaki y Medzhitov 2015).

1.1.1. Inmunidad innata

Los mecanismos de la inmunidad innata están protagonizados por una diversidad de moléculas y células del organismo, y son constitutivos, esto es, están listos para actuar de inmediato, en cuanto se detecta la presencia en el medio interno de productos, componentes o estructuras microbianos, a los que se ha denominado PAMPs («*pathogen-associated molecular patterns*», es decir, patrones moleculares asociados a patógenos); los PAMPs son comunes a grandes grupos microbianos (componentes de la pared bacteriana como el muramil-dipéptido, DNA bacteriano rico en motivos CpG no metilados, RNA bicatenario viral...) y son reconocidos por receptores codificados en la línea germinal, denominados PRRs («*pattern recognition receptors*») (Tang *et al.* 2012; Gasteiger *et al.* 2017; Marshall *et al.* 2018). Además, los PRRs reconocen moléculas propias que se liberan cuando ocurre un daño tisular, denunciando la actividad nociva de los patógenos en el curso de la infección; estas moléculas se denominan DAMPs («*damage-associated molecular patterns*», patrones moleculares asociados al daño), y entre ellos figuran ácido hialurónico, fibronectina, ATP, ácido úrico, RNA mensajero (mRNA) y proteínas intracelulares como histonas, ciclofilina A, proteínas de choque térmico, interleucina 33 (IL-33), calrreticulina, etc. (Roh y Sohn 2018). Los PRRs pueden ser proteínas presentes en el plasma y líquidos orgánicos, como las lectinas de tipo C (de las que es ejemplo la MBL «mannose-binding lectin»), o bien estar asociados a células (inmunitarias o epiteliales), como es el caso de los TLRs («*Toll-like receptors*»), NLRs («*NOD-like receptors*», donde NOD son las siglas de «*nucleotide-binding oligomerization domainand*»), RLRs («*RIG-I-like receptors*», siendo RIG-I el acrónimo de «*retinoid acid-inducible gene I*») y STING («*stimulator of IFN genes*»); los TLRs son receptores trans-membrana, que ubican en la superficie celular o en membranas intracelulares (del retículo endoplásmico o los lisosomas), mientras que NLRs, RLRs y STING son citosólicos (Tang *et al.* 2012; Gasteiger *et al.* 2017; Wicherska-Pawłowska *et al.* 2021). El reconocimiento de PAMPs y DAMPs por sus respectivos PRRs genera señales bioquímicas de activación de sistemas defensivos como el complemento (conjunto de proteínas plasmáticas que se activan secuencialmente y que liberan fragmentos bioactivos) o de células que liberan citocinas (fig. 1): el resultado es la reacción inflamatoria, caracterizada por la extravasación de plasma y de células inflamatorias fagocíticas (primariamente leucocitos polimorfonucleares neutrófilos); las citocinas proinflamatorias vasoactivas son las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y el factor necrosante de tumores alfa (TNF-α), además de la IL-8, que atrae quimiotácticamente a los neutrófilos; por su parte, las fracciones bioactivas del complemento activan a los mastocitos, que liberan aminas vasoactivas (mediadores de inflamación), atraen quimiotácticamente a las células inflamatorias y facilitan la fagocitosis por opsonización, además de formar un complejo de ataque a membrana que puede lisar a bacterias Gram-negativas y a virus con envoltura (Marshall *et al.* 2018). Hay otros importantes mecanismos de inmunidad innata, como la citotoxicidad natural, mediada por varios tipos de células, como las NK («Natural Killer»), capaces de destruir células infectadas por patógenos intracelulares como los virus (Gasteiger *et al.* 2017; Marshall *et al.* 2018); y la respuesta de interferones, proteínas capaces de abortar infecciones virales y que, a diferencia de otros mecanismos de la inmunidad innata, no son constitutivas sino que su producción es inducida por determinados estímulos, como la presencia intracelular de RNA bicatenario.

1.1.2. Inmunidad específica

La rápida puesta en marcha de los mecanismos defensivos de la inmunidad innata puede eliminar por completo a microorganismos patógenos con un perfil de virulencia modesto, pero hay patógenos que poseen factores de

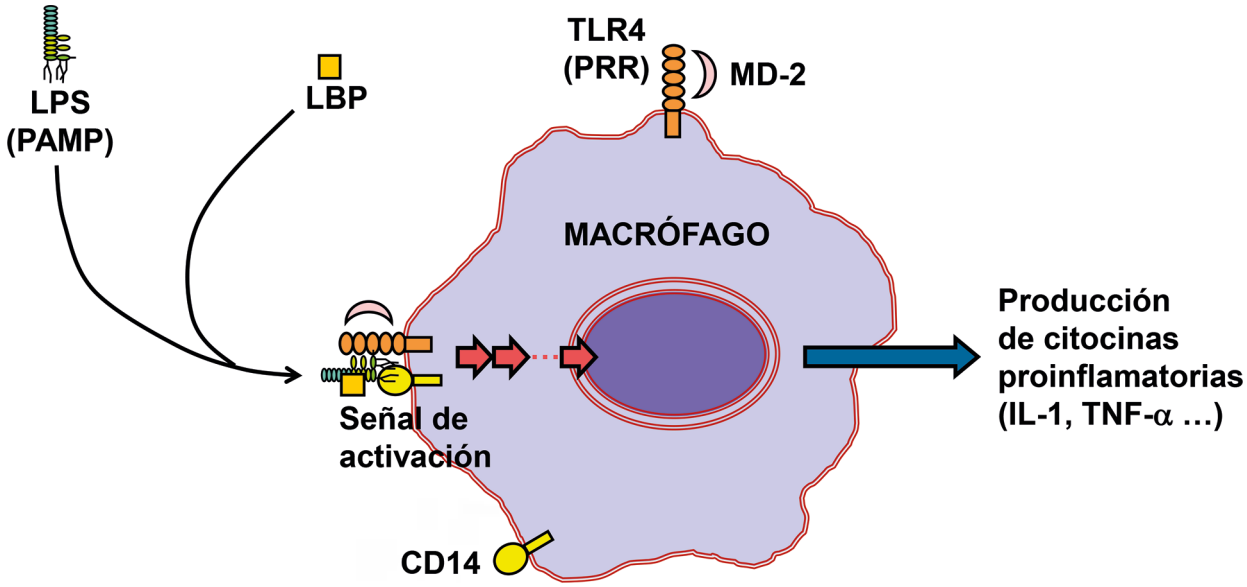


Figura 1. Ejemplo de respuesta de inmunidad innata. El lipopolisacárido (LPS) presente en la pared de las bacterias Gram-negativas es un PAMP, que es reconocido por un PRR, en este caso el TLR4. La proteína plasmática LPB (*LPS-binding protein*) y las proteínas macrofágicas MD-2 y CD14 intervienen como auxiliares en el reconocimiento y la generación de la señal de activación, que se transmite al núcleo del macrófago: la vía de señalización concluye con la activación del factor de transcripción NF-κB, que penetra en el núcleo para activar la expresión de genes que codifican para citocinas proinflamatorias. La secreción de estas citocinas pone en marcha una respuesta inflamatoria

virulencia que les permiten resistir o evadirse de estos mecanismos; en estos casos, la inmunidad innata intentará contener la infección hasta que puedan operar los mecanismos de la inmunidad específica, más eficaces, que en la mayoría de los casos consiguen la «inmunidad esterilizante», es decir, la eliminación completa del patógeno. Aunque intervienen otros tipos de células, ya sea como auxiliares o como efectoras, los protagonistas de la inmunidad específica son los linfocitos B, que realizan la respuesta de anticuerpos, y los linfocitos T, cuyas numerosas subpoblaciones llevan a cabo distintas funciones de cooperación en las respuestas y de la llamada inmunidad celular (fig. 2). Tanto los linfocitos B como los T poseen receptores específicos, distribuidos clonalmente, que reconocen estructuras moleculares denominadas epítopos. Los receptores de las células B (BCR, de «*B-cell receptor*») son inmunoglobulinas de membrana, mientras que los de las células T (TCR, de «*T-cell receptor*») están constituidos por heterodímeros α/β, y en ambos casos están codificados por conglomerados resultantes de la reorganización de fragmentos génicos presentes en la línea germinal, reorganización que ocurre en cada una de las células precursoras de un clon; por tanto, todos los componentes de un clon comparten receptores de la misma especificidad, que reconocen un determinado epítopo. Como consecuencia de este mecanismo combinatorio, el número de receptores específicos que genera el organismo de un mamífero como el ser humano es muy grande (varios millones), mientras que el número de receptores de la inmunidad innata es mucho más limitado (además de que estos no están distribuidos clonalmente). Cuando los linfocitos de un clon interaccionan apropiadamente con una molécula portadora de los correspondientes epítopos, se activan e inician una respuesta inmune. Los antígenos son moléculas capaces de inducir respuestas inmunes específicas; por tanto, los antígenos han de poseer epítopos reconocibles por clones de linfocitos.

Activación de linfocitos B

Los linfocitos B son capaces de unir a través de sus epítopos al antígeno nativo, pero en la mayor parte de los casos requieren señales coestimuladoras para activarse. Estas señales proceden de una población de linfocitos T, las células Th ya mencionadas en la Introducción de este capítulo y pueden ocurrir mediante interacciones célula-célula (entre ligandos y receptores presentes en las superficies de las células implicadas) o por acción de citocinas producidas por las células Th. Una vez activadas, las células B proliferan y se diferencian finalmente en plasmocitos, que producen los anticuerpos específicos (inmunoglobulinas) que aparecen en la sangre y otros líquidos orgánicos, constituyendo la respuesta de inmunidad humoral (fig. 3). Los anticuerpos cumplen varias funciones defensivas: neutralización de toxinas y de virus, interferencia con la adhesión de patógenos a células del hospedador, contribución a la eliminación de patógenos mediante activación del complemento o por facilitación de la fagocitosis: la IgG actúa como una opsonina, que por su parte específica se une a antígenos en

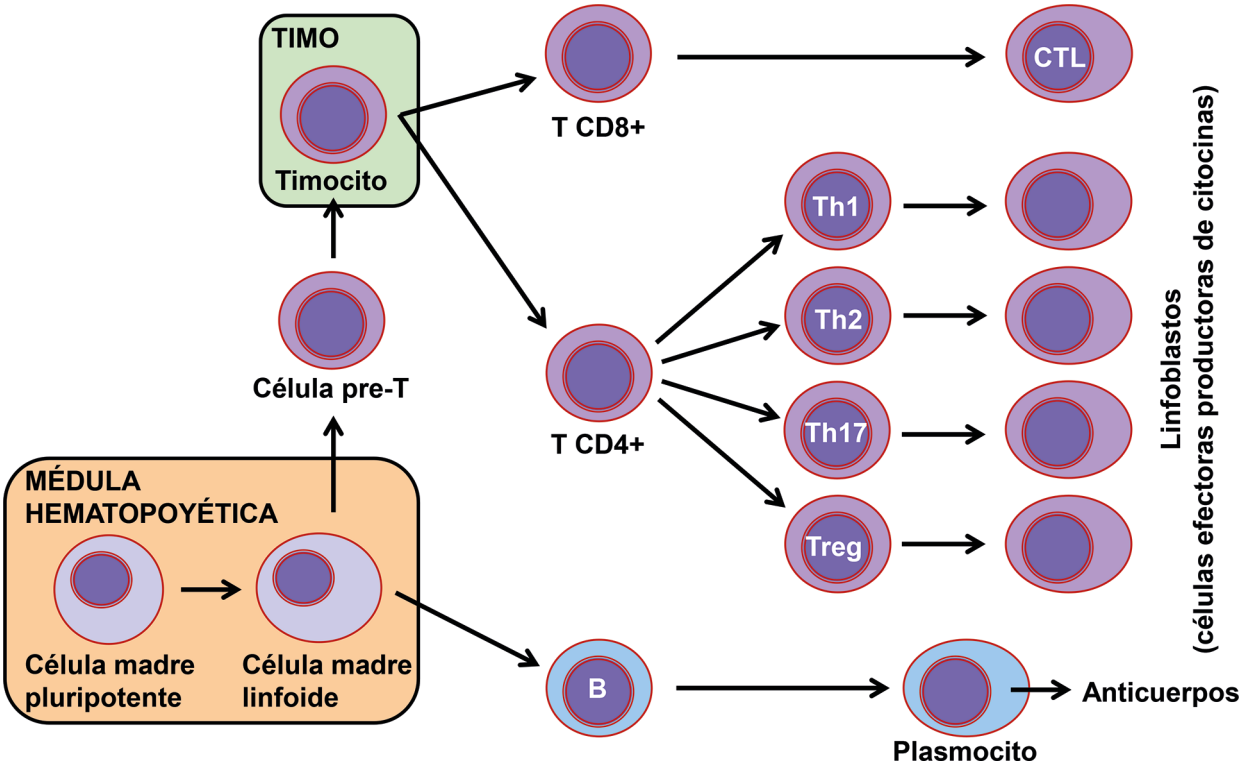


Figura 2. Como todas las células hemáticas, los linfocitos se originan en la médula ósea hematopoyética (médula roja). De las células madre linfoides se diferencian las células B, que abandonan la médula como linfocitos inmunocompetentes (es decir, capaces de reconocer antígenos y de realizar respuestas de anticuerpos) para colonizar el tejido linfoide periférico; y las células pre-T, que salen como células inmaduras que completan su maduración y adquieren su repertorio de especificidades en el timo, para finalmente pasar al tejido linfoide periférico como células T inmunocompetentes. Las células T se diferencian a su vez en T cooperadoras (Th,*helper*), caracterizadas por el marcador CD4, y T citotóxicas, con el marcador CD8. Las células T CD4+ se distribuyen en varias subpoblaciones, de las que en la Figura se representan cuatro: Th1, implicadas en las respuestas frente a patógenos intracelulares; Th2, que participan en la inmunidad frente parásitos; Th17, que cooperan con células B y responden frente a patógenos bacterianos y fúngicos; y otras subpoblaciones, incluyendo las células T reguladoras (Treg) responsables de la terminación de las respuestas y la tolerancia (ausencia de respuesta). Una vez activadas en respuesta a antígenos específicos, las células B se convierten en plasmocitos, productores de anticuerpos; las diversas subpoblaciones de células T CD4+, en linfoblastos efectores que producen distintos perfiles de citocinas; las células T CD8+ se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL) que destruyen a las células en cuyas superficies encuentren sus antígenos específicos

la superficie de los patógenos y por la inespecífica a receptores designados como FcγR (estos receptores, presentes en los fagocitos, se unen a la parte inespecífica o Fc de las cadenas pesadas gamma propias de la clase IgG), asegurando el contacto entre patógenos específicos y la superficie de los fagocitos, que es necesario para iniciar la fagocitosis.

Activación de linfocitos T

Los linfocitos T no son capaces de unir antígenos nativos, sino que solo reconocen trozos de antígeno (generalmente, oligopéptidos procedentes de la degradación parcial de los antígenos proteicos) que se presentan en combinación con moléculas codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de «*major hystocompatibility complex*») ubicadas en la superficie de células propias (fig. 4). Las células Th, así denominadas porque cooperan con («socorren a») otras células para que estas cumplan eficazmente sus funciones (p. ej., cooperan con las células B para que las respuestas de anticuerpos sean eficientes), son portadoras del marcador CD4 y, a través de sus receptores específicos, reconocen oligopéptidos asociados a moléculas del MHC de clase II, existentes en la superficie de células auxiliares (células dendríticas y macrófagos) que previamente han endocitado al antígeno y lo han procesado para dicha presentación.

Existen varias subpoblaciones de células Th (Th1, Th2, Th17...) (fig. 2), que una vez activadas producen distintos perfiles de citocinas y cumplen distintas funciones. En general, las células Th1 regulan la inmunidad frente a patógenos intracelulares; las Th2 son necesarias para la protección contra la infección por helmintos y están implicadas en reacciones de hipersensibilidad; y las Th17 actúan en la defensa frente infecciones bacterianas y fúngicas. Otra población de células T, las células T citotóxicas (Tc), caracterizadas por el marcador CD8, reconocen oligopéptidos de antígenos sintetizados en el

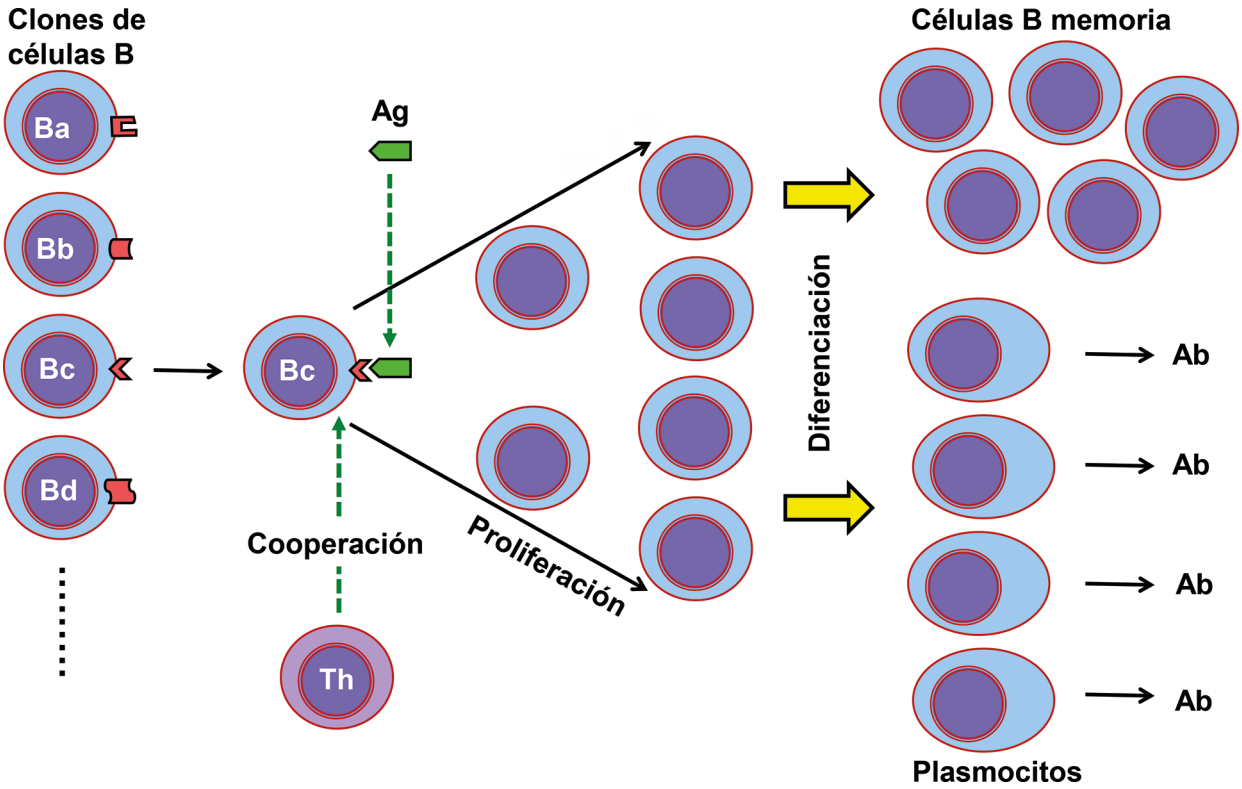


Figura 3. Los linfocitos (tanto B como T) está organizados en clones. Cada clon es una familia de células que proceden de una que ha reorganizado sus genes para configurar un receptor específico (una inmunoglobulina de superficie, en el caso de células B, y un heterodímero α/β, en el caso de las células T); por tanto, todas las células de un mismo clon expresan receptores de la misma especificidad. Cuando llega un antígeno, selecciona células de los clones con receptores específicos para él; en la Figura, se representan varios clones de células B, nombrados arbitrariamente como Ba, Bb, Bc, Bd..., de los cuales el clon Bc es específico para el antígeno que ha aparecido en el medio interno. Como consecuencia de la unión del antígeno, los linfocitos de ese clon inician su activación, que generalmente requiere, para completarse, de la cooperación de células Th (T *helper*). La activación consiste en la proliferación de las células (convertidas en linfoblastos) y su diferenciación en plasmocitos (células productoras de anticuerpos específicos para el antígeno) y en células de memoria

interior de las células las cuales los presentan asociados a moléculas del MHC de clase I, que se producen por todas las células nucleadas del cuerpo; esto permite que una célula infectada por un patógeno intracelular presente epítopos de ese patógeno a las células Tc. Una vez activadas, las Tc se convierten en linfocitos T citotóxicos (CTL, de «*cytotoxic T lymphocytes*»), que destruirán a las células en cuya superficie reconozcan a los correspondientes epítopos específicos asociados a moléculas MHC-I. Esta citotoxicidad específica es una de las ramas de la inmunidad celular; la otra consiste en la activación de macrófagos por citocinas liberadas por células Th1 (como el interferón gamma, IFN-γ), lo que les confiere la capacidad de matar a patógenos intracelulares que, en condiciones normales, resistirían a sus mecanismos microbicidas.

Respuesta primaria y memoria inmune

Como se desprende de lo expuesto, la inmunidad específica se adquiere a través de respuestas complejas, que requieren tiempo: debe propiciarse el encuentro entre los linfocitos y los antígenos (generalmente ocurre en tejido linfoide, como ganglios linfáticos, placas de Peyer, tejido linfoide esplénico...); los antígenos han de ser procesados y presentados a las células T; deben ocurrir los fenómenos de cooperación entre células Th y células B o Tc; los linfocitos activados han de proliferar y diferenciarse en células efectoras (plasmocitos, células Th productoras de citocinas y CTLs) y en células «memoria». La respuesta que ocurre la primera vez que el sistema inmune de un individuo entra en contacto con un antígeno determinado, es decir, cuando los linfocitos que responden son «vírgenes» (no han sido estimulados antes por ese antígeno), se denomina «respuesta primaria» y tarda un lapso de tiempo en desarrollarse, pero los clones que responden se expanden y generan células memoria ya diferenciadas (fig. 3); en consecuencia, en ulteriores contactos con el mismo antígeno, la respuesta es significativamente más rápida y potente. A esta memoria de la inmunidad específica se la denomina «anamnesis». Clásicamente, la memoria inmune se ha considerado exclusiva de la inmunidad específica; sin embargo, en los últimos

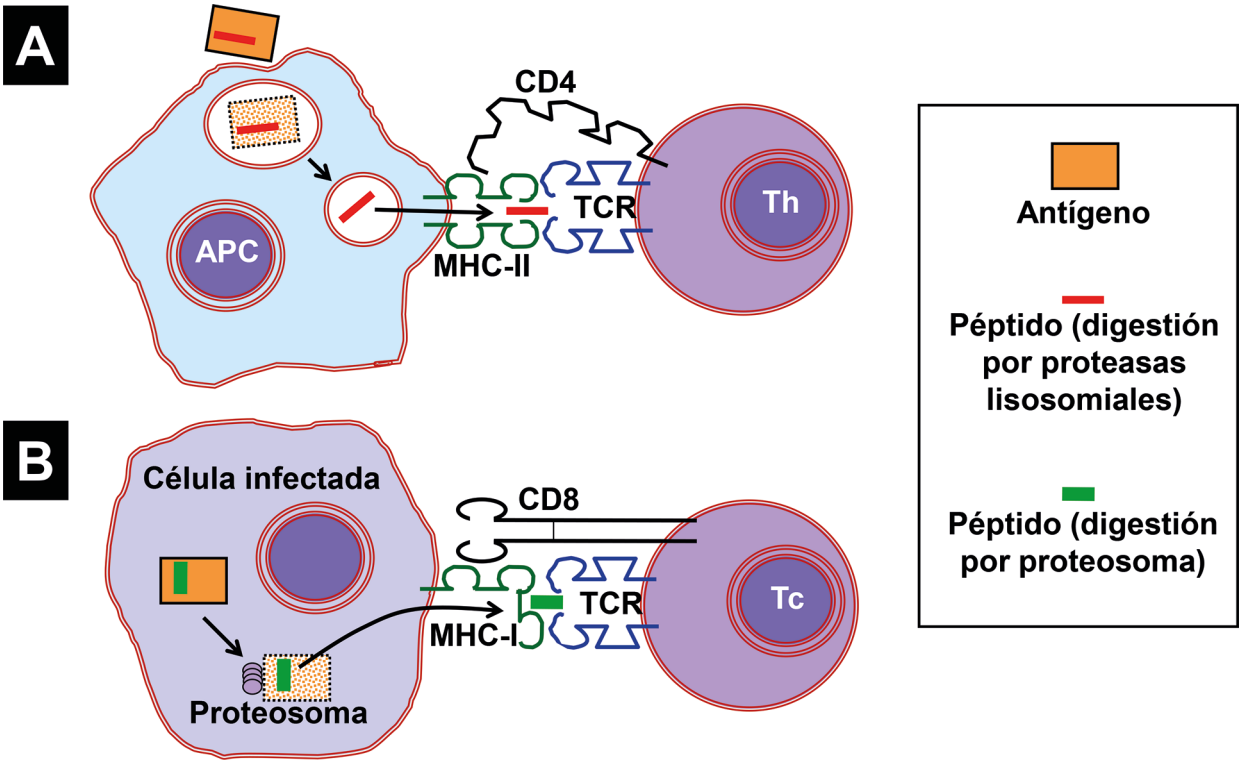


Figura 4. Presentación de antígenos a las células T: a diferencia de los linfocitos B, los T no son capaces de reconocer epítopos directamente sobre antígenos nativos, sino que necesitan que los epítopos les sean presentados por otras células, asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). **A**, Los macrófagos y células dendríticas son células auxiliares presentadoras de antígenos (APC), que capturan por endocitosis antígenos los cuales son procesados mediante proteasas lisosomiales (procesamiento de antígenos exógenos), generando oligopéptidos algunos de los cuales actúan como epítopos para las células Th; estos oligopéptidos se asocian a moléculas MHC de clase II (macrófagos y células dendríticas son, junto a las células B, los pocos linajes celulares que expresan moléculas MHC-II) y son expuestos en la superficie celular. La molécula CD4 de las células Th tiene afinidad por las partes no polimórficas de las moléculas MHC-II (los dominios próximos a la superficie celular); por ello, las células Th tienen tendencia a unirse transitoriamente con las células que expresan estas moléculas y, mediante su receptor específico (TCR) examinan la combinación propio (las partes polimórficas de la molécula MHC-II) más extraño (el oligopéptido encajado entre ellas). **B**, cuando una célula de cualquier tejido es infectada por un patógeno intracelular, los antígenos que el patógeno sintetiza dentro de la célula (antígenos endógenos) son procesados por proteasas del proteosoma y algunos oligopéptidos encajan en moléculas MHC-I (que son producidas por todas las células nucleadas del organismo) y son presentados a las células T citotóxicas, cuyo marcador CD8 tiene afinidad por partes no polimórficas de las moléculas MHC-I. En la Figura no se han representado las moléculas CD3, asociadas al heterodímero α/β del TCR, ni la β-2-microglobulina, que mantiene desplegada a la molécula MHC-I

años se ha observado que células de la inmunidad innata (e incluso células no inmunitarias) pueden retener durante un cierto tiempo la memoria de su encuentro con patógenos, como consecuencia de la activación de sus PRRs por PAMPs; por tanto, se trata de una memoria no específica, que no va dirigida a un patógeno concreto, sino más bien un estado de inmunopotenciación inespecífica debida a cambios epigenéticos y funcionales que incrementan la resistencia a infecciones posteriores por distintos patógenos (Sherwood *et al.* 2022).

Si fijamos nuestra atención en la respuesta de anticuerpos, más fácil de medir que la inmunidad celular, se observa que entre el contacto con el antígeno (o, en su caso, el inicio de la infección) y a la aparición de una respuesta de anticuerpos detectable en sangre transcurre un período (de duración variable, ya que influyen muchos factores, pero que puede oscilar alrededor de dos semanas), al que se denomina «período ventana» (fig. 5). En el caso de una infección, durante el período ventana el paciente está infectado pero es seronegativo, y su defensa corre a cargo de la inmunidad innata. Al inicio de la seropositividad los anticuerpos pertenecen a la clase de las inmunoglobulinas M (IgM), pero progresivamente son sustituidos de forma irreversible por IgG; este cambio de clase de inmunoglobulina depende de la cooperación de células Th. El proceso de maduración de afinidad, que también requiere la cooperación de una subpoblación de células Th (células T foliculares), hace que a lo largo de la respuesta se seleccionen aquellos subclones B (de entre los generados por un mecanismo de hipermutación) que producen anticuerpos de mayor afinidad por el antígeno, es decir, que se unen a él con más fuerza. Por todo ello, una vez establecida la memoria inmunológica, los nuevos contactos con el mismo antígeno inducen respuestas

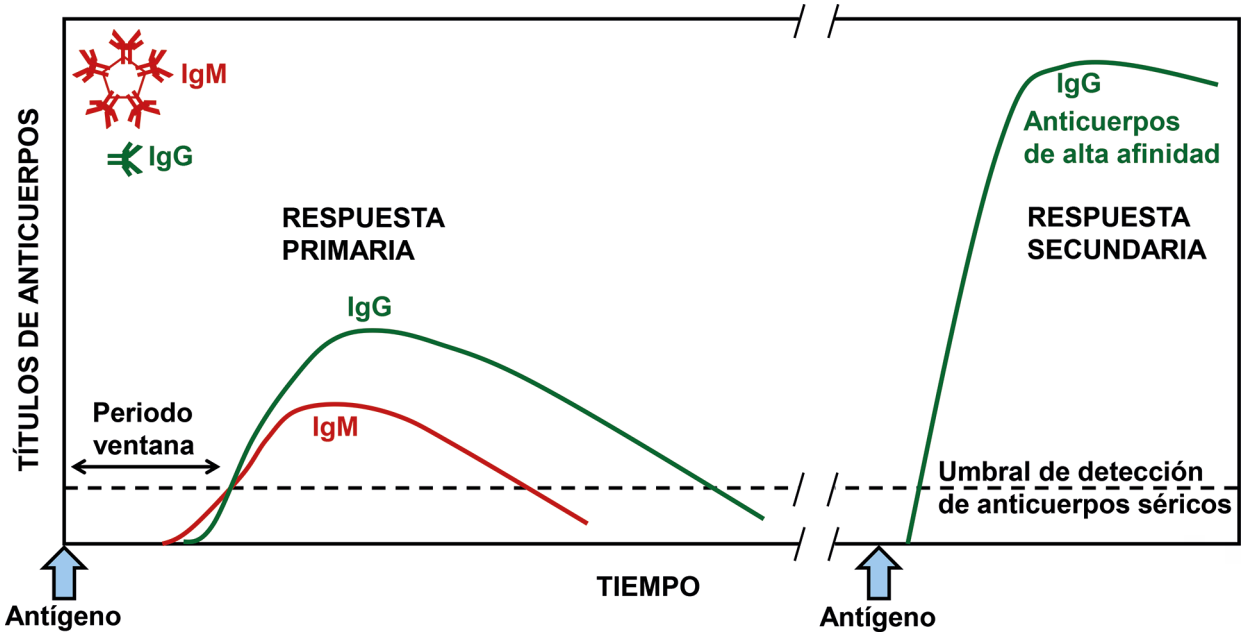


Figura 5. Cinética de la respuesta de anticuerpos. Tras el primer contacto con el antígeno, aparecen en sangre los anticuerpo específicos, que se pueden detectar y cuantificar mediante inmunoensayos con el plasma o el suero. El periodo de tiempo que transcurre entre la inmunización y la aparición de los anticuerpos se denomina "periodo ventana", y corresponde al tiempo que tardan los linfocitos en elaborar sus respuestas. En esta respuesta primaria, los anticuerpos que aparecen primero pertenecen a la clase IgM (pentámeros de inmunoglobulinas con cadenas pesadas de la clase μ), y les siguen anticuerpos de la misma especificidad pero de la clase IgG (monómeros de inmunoglobulinas con cadenas pesadas de clase γ). Como el cambio de clase de inmunoglobulina es un acontecimiento irreversible (conlleva la deleción del fragmento de gen que codifica para la parte constante de la cadena μ), los anticuerpos IgG se hacen predominantes mientras la IgM disminuye con el tiempo hasta ser indetectable. Si tiempo después ocurre una nueva inmunización con el mismo antígeno, la respuesta (denominada secundaria) corre a cargo de las células de memoria (tanto B como Th); dado que estas células ya están diferenciadas y que su número es grande (consecuencia de la proliferación que expandió a los clones que respondieron al primer contacto), el periodo ventana se acorta mucho, los anticuerpos son de clase IgG y su cantidad es mucho mayor. Además, a lo largo de la respuesta aumenta la afinidad (fuerza de unión) de la IgG por el antígeno, por lo que en la respuesta secundaria los anticuerpos son de alta afinidad

de IgG (la IgM está ausente) y alta afinidad, lo que se conoce como «respuestas secundarias» (fig. 5).

Son innumerables las revisiones y textos que presentan una visión resumida del sistema inmune y su funcionamiento, y que no se han incluido en los párrafos anteriores para no entorpecer la lectura; pueden recomendarse las de Iwasaki y Medzhitov (2015), Marshall *et al.* (2018) y la lectura de A. Helmberg, actualizada en 2023 (http://www.helmberg.at/immunology.pdf).

Evasión de la inmunidad

A lo largo de su coevolución con los hospedadores, los microorganismos patógenos han adquirido factores de virulencia y estrategias que les permiten evadir, aunque sea temporalmente, los mecanismos defensivos de la inmunidad innata y de la inmunidad específica (cuanto más dure la infección, más probabilidades tiene el patógeno de trasmitirse a otros hospedadores). Por ejemplo, algunos virus interfieren con las vías de señalización iniciadas por PRRs, o con la producción de interferones o los mecanismos efectores inducidos por ellos; las mutaciones en sus antígenos les permiten escapar de las respuestas de la inmunidad específica; algunos interfieren con la presentación de antígenos por moléculas del MHC, o bien tienen efectos inmunosupresores (Ambagala *et al.* 2005; Ressing *et al.* 2015; Ma *et al.* 2016; Schulz y Mossman 2016; Hsu 2018; Kikkert 2020).

1.2. ¿Qué es una vacuna?

Las vacunas son formas farmacéuticas que contienen un producto biológico capaz de inducir respuestas inmunitarias específicas en el individuo vacunado, que confieren, de forma segura, protección frente a enfermedades infecciosas específicas (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2015; Pollard y Bijker 2021). En su sitio web, los CDC (*Centers for Disease Control and Prevention)* proponen una definición más amplia: las vacunas serían preparados que se utiliza para estimular la respuesta inmunitaria del organismo frente a las enfermedades (https://www.cdc.gov/vaccines/vac-gen/imz-basics.htm); esta definición permite incluir a las vacunas frente a enfermedades no infecciosas, como diversas formas de cáncer. Es importante insistir en que el objetivo de la vacunación es conferir

protección frente las manifestaciones clínicas de la infección, es decir, frente a la enfermedad, y esencialmente frente a las formas graves de la enfermedad; si además una vacuna impide el asentamiento del agente infeccioso en el hospedador y, por tanto, impide el contagio, esto debe considerarse un valor añadido. Así, de las conocidas vacunas frente a la poliomielitis, la vacuna Sabin (virus atenuado, de administración oral) induce inmunidad mucosal e impide la infección (y por tanto la trasmisión) del virus silvestre; mientras que la vacuna Salk (virus inactivado, administración parenteral) solo induce inmunidad sistémica y no impide la infección, la replicación del virus silvestre en la mucosa intestinal y su trasmisión por vía fecal/oral, pero protege de la enfermedad al individuo vacunado. Actualmente y desde hace muchos años (en España, desde 2004) se utiliza la vacuna Salk, más segura, ya que la nula circulación del virus silvestre hace innecesaria la función de «cortafuegos» epidemiológico que aporta la vacuna Sabin. Estas consideraciones son pertinentes, ya que algunas de las críticas hechas a las vacunas frente a la COVID-19 se basan precisamente en que la mayoría no impide el contagio ni la trasmisión, aunque suministran protección eficaz frente a las formas graves de la enfermedad.

Clásicamente, la protección que suministran las vacunas se ha vinculado con las respuestas de anticuerpos específicos frente a antígenos del agente infeccioso, así como con el desarrollo de memoria inmunológica específica, pero está claro que la inmunidad celular desempeña un papel importante en la defensa frente a patógenos intracelulares; algunas evidencias sugieren que frente a estos patógenos la prevención de la infección corre a cargo de la respuesta de anticuerpos (lo que obviamente implica la colaboración de las células Th con las células B), mientras que las células Tc son necesarias para controlar y eliminar la infección establecida (Pollard y Bijker 2021).

1.2.1. Antígenos protectores

Un microorganismo contiene una diversidad de antígenos; incluso los más sencillos, como son los virus, poseen en sus genomas información para producir un cierto número de proteínas antigénicas, ya sean estructurales (constitutivas del virión) o no (presentes solo en las células infectadas, donde cumplen funciones implicadas en el ciclo biológico del virus). El sistema inmune reconoce y responde frente a todos estos antígenos, pero no todas esas respuestas son útiles para el hospedador; muchas respuestas pueden ser inútiles y hasta perjudiciales si provocan situaciones inmunopatológicas como las reacciones de hipersensibilidad o incluso la ruptura de la tolerancia frente a autoantígenos, que conduciría a patologías autoinmunitarias. En la Introducción de este capítulo se ha mencionado como las vacunas con virus enteros inactivados frente al SARS y el MERS podían promover reacciones adversas de hipersensibilidad cuando los animales vacunados eran desafiados con los correspondientes virus, y también se ha hecho alusión a la posibilidad de que algunas vacunas indujesen respuestas de anticuerpos que, en vez de neutralizar al virus, facilitasen la infección de células carentes del receptor natural del mismo pero poseedoras del FcγR. La complejidad antigénica de los microorganismos patógenos nos lleva al concepto de «antígenos protectores», que son aquellos que inducen respuestas inmunes que suministran al individuo vacunado una protección efectiva frente a la infección (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2015; Pollard y Bijker 2021). Es común que en un antígeno protector existan varios epítopos, algunos de los cuales inducen respuestas protectoras mientras que otros inducen respuestas inútiles (anticuerpos no neutralizantes) o perjudiciales (anticuerpos facilitadores de la infección); la identificación de los epítopos protectores permite diseñar vacunas más eficientes (Sanchez-Trincado *et al.* 2017). Obviamente, una vacuna deberá contener antígenos protectores (independientemente de que pueda contener también antígenos irrelevantes, como ocurre con las vacunas de microorganismos enteros) o sus epítopos significativos, o la información necesaria para que tales antígenos se sinteticen en células del individuo vacunado.

1.3. Evolución de las vacunas

1.3.1. De las primeras vacunas a las actuales

Aunque el conocimiento empírico de la adquisición de inmunidad frente a las infecciones es antiguo, fue Edward Jenner el autor la primera descripción científica de la vacunación con su trabajo sobre la vacuna frente a la viruela, publicado a finales del siglo XVIII; hubieron de transcurrir 80 años hasta que Louis Pasteur iniciara el desarrollo sistemático de los procedimientos de inmunoprevención de enfermedades infecciosas, utilizando distintos procedimientos de atenuación de la virulencia para elaborar vacunas frente al cólera de las gallinas, el ántrax y la rabia (Plotkin 2014; Karch y Burkhard 2016; Iwasaki y Omer 2020). Los últimos años del siglo XIX vieron aparecer otra opción, la obtención de vacunas con microorganismos patógenos muertos, como fueron las de la fiebre tifoidea, el cólera y la peste bubónica (Iwasaki y Omer 2020). Siguieron, ya en década de los veinte, las vacunas frente a enfermedades causadas por bacterias toxicogénicas (difteria, tétanos), basadas en toxoides (Plotkin 2014; Karch y Burkhard 2016); y sucesivamente, se fueron introduciendo vacunas frente a enfermedades bacterianas como la tuberculosis (BCG) y virales

como la fiebre amarilla, gripe, poliomielitis, sarampión, parotiditis, rubeola... (André 2003; Plotkin 2014). La tecnología del DNA recombinante, desarrollada en los años 70, aportó en 1986 la primera vacuna recombinante, constituida por el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. En la actualidad se dispone de gran número de vacunas de eficacia y seguridad probadas, lo que ha permitido elaborar calendarios de vacunación pediátrica, así como proponer un número considerable de vacunas a distintos colectivos como personas de edad avanzada, personas que viajan a zonas donde existen enfermedades endémicas, trabajadores relacionados con la sanidad, pacientes inmunocomprometidos, etc. (Esposito *et al.* 2014).

1.3.2. Adyuvantes

Una vacuna eficaz debe estar formulada y administrada de manera que se facilite el encuentro entre los antígenos y las células inmunitarias en el contexto apropiado del tejido linfoide; el antígeno debe persistir el tiempo suficiente para que la inducción de la respuesta sea óptima; y debe haber también una estimulación de mecanismos de inmunidad innata (a través de PRRs), que generan señales coestimuladoras (ya sea a través de citocinas o por contacto célula-célula) para la correcta activación de los linfocitos. Por lo general, las vacunas con microorganismos enteros, ya sean atenuadas o inactivadas, reúnen estas condiciones y poseen una inmunogenicidad satisfactoria, ya que son captados por el drenaje linfático que los lleva a los ganglios linfáticos locales o regionales y el propio microorganismo posee PAMPs y/o provoca la liberación de DAMPs que actúan sobre PRRs propiciando la participación de células de la inmunidad innata; pero las vacunas constituidas por fracciones o proteínas antigénicas (vacunas subunidad) no reúnen estas condiciones y su inmunogenicidad suele ser escasa (Moyer *et al.* 2016; Wang y Xu 2020). Los adyuvantes o coadyuvantes de la respuesta inmune son compuestos, de naturaleza inorgánica u orgánica y generalmente no antigénicos, que se incorporan a ciertas vacunas para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos vacunales (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2015; Moyer *et al.* 2016). Esta mejora incluye tanto la inducción de respuestas más potentes como su modulación, favoreciendo las ramas más adecuadas de la inmunidad específica. Para que su uso sea aceptable en humanos, los adyuvantes deben cumplir ciertos requisitos: han de potenciar de forma significativa las respuestas de inmunidad humoral (de anticuerpos) y celular; deben promover una inmunidad duradera y potenciar la memoria inmunológica; no deben ser tóxicos; no debe inducir respuestas autoinmunes o alérgicas (Azmi *et al.* 2014).

Mecanismos de acción de los adyuvantes

Los mecanismos de acción de los adyuvantes son varios: ralentizan la liberación del antígeno, mejorando su biodisponibilidad; promueven la migración de células de la inmunidad innata, que intervienen como auxiliares en la respuesta; optimizan la biodistribución del antígeno y su tráfico hacia los órganos linfoides; actúan como agonistas de PRRs y/o producen un daño tisular limitado, pero suficiente para la emisión de DAMPs, todo lo cual estimula la emisión de señales coestimuladoras por las células auxiliares y mejora la presentación de antígenos (Moyer *et al.* 2016; Wang y Xu 2020). Obviamente, no todos los adyuvantes conocidos cumplen todos estos mecanismos de acción; así, por ejemplo, adyuvantes clásicos en vacunas humanas como son los derivados de aluminio (hidróxido, fosfato, sulfato) adsorben antígenos que son liberados lentamente en el lugar de la inyección, lo que prolonga el estímulo inmunitario, y además dañan a algunas células que liberan DAMPs, con el resultado de potenciar la respuesta de anticuerpos pero no la inmunidad celular; pero el adyuvante complejo AS04, que consiste en hidróxido de aluminio y monofosforil lípido A (el lípido A es el componente tóxico del lipopolisacárido de las bacterias Gram-negativas y es agonista del TLR4 o «*Toll-like receptor 4*»), potencia ambos tipos de inmunidad, humoral y celular (Wang y Xu 2020).

Adyuvantes y presentación de antígenos

Todos los mecanismos de acción de los adyuvantes implican la estimulación, ya sea directa o indirecta, de las células auxiliares presentadoras de antígenos, fundamentalmente de las células dendríticas (Azmi *et al.* 2014). Las células dendríticas son cruciales en la presentación de antígenos a las células Th cuya cooperación es necesaria tanto para las respuestas de anticuerpos como para la inmunidad celular. Hay distintas subpoblaciones de células dendríticas, cada una con diferentes PRRs, que controlan el tipo de respuestas Th, y la incorporación a las vacunas de determinados adyuvantes (incluyendo agonistas de PRRs) permite por tanto modular las respuestas a los antígenos vacunales, potenciando las respuestas óptimas y silenciado las indeseables (Nabel 2013; Sherwood *et al.* 2022). En la Introducción de este capítulo se ha comentado la posibilidad de inhibir, mediante adyuvantes, la respuesta Th2 a vacunas con virus enteros inactivados frente al SARS y el MERS, responsable de reacciones adversas de hipersensibilidad. Otro ejemplo es el uso de dinucleótidos cíclicos, agonistas de STING, que potencian las respuestas de las células Th1 y Th17, aumentando la eficacia de vacunas frente a patógenos intracelulares (Van Dis *et al.* 2018). Como se ha indicado en la sección 1.1 al tratar de la inmunidad celular, la generación de CTLs requiere la presentación a las células Tc de epítopos

procedentes del procesamiento de antígenos sintetizados dentro de la célula presentadora, asociados a moléculas MHC-I (es la llamada vía de procesamiento de antígenos endógenos). Ahora bien, esto solo ocurrirá con vacunas atenuadas de patógenos intracelulares, que puedan infectar de forma limitada algunas células presentadoras para que dentro de ellas se sinteticen dichos antígenos (actualmente, también ocurre con vacunas vectorizadas por virus, vacunas de DNA y vacunas de mRNA, ya que en todas ellas se sintetizan antígenos del patógeno dentro de células); en el caso de las vacunas subunidad el antígeno no es sintetizado dentro de las células presentadoras, sino que es endocitado, procesado por la vía de los antígenos exógenos y presentado a células Th asociado a moléculas MHC-II, aunque existe la posibilidad de que algunas moléculas de antígenos exógenos sigan la vía de los antígenos endógenos, se asocien a moléculas MHC-I y sean así presentados a células Tc: es lo que se conoce como «presentación cruzada». Recientemente se han desarrollado algunos adyuvantes (nanopartículas a base de aluminio, adyuvantes de saponina y agonistas de TLRs) que refuerzan la presentación cruzada, haciendo posible que vacunas subunidad induzcan una inmunidad celular satisfactoria con generación de CTLs (Ho *et al.* 2018).

Liposomas, virosomas y VLPs

Las vesículas lipídicas (liposomas), construidas con bicapas de lípidos apropiados y eventualmente con agonistas de PRRs, en las cuales se incluyen antígenos vacunales constituyen un sistema de administración con efecto adyuvante, ya que incrementan la inmunogenicidad de los antígenos incluidos (Wang y Xu 2020). Si las vesículas se construyen con lípidos y glicoproteínas de envolturas víricas, se denominan virosomas, que pueden vehiculizar antígenos vacunales de diversos patógenos (Wang y Xu 2020). Algunas vacunas frente a virus se preparan aprovechando la capacidad que las proteínas de la cápsida tienen para autoensamblarse, formando partículas similares a viriones paro vacías (no albergan genoma viral): estas formas vacunales se denominan VLPs («*virus-like particles*») y son notablemente más estables e inmunógenas que las correspondientes vacunas de proteínas individuales (subunidad), siendo capaces de potenciar la presentación cruzada y, por tanto, buenas respuestas de inmunidad tanto humoral como celular (Wallis *et al.* 2019; Brisse *et al.* 2020).

1.3.3. Perspectivas de las vacunas

El diseño de las vacunas del futuro debe tener en cuenta el desafío de las adaptaciones de muchos patógenos para evadir las respuestas de la inmunidad específica. En el caso de patógenos que, como ocurre con muchos virus, modifican la especificidad de sus antígenos protectores como consecuencia de mutaciones, se recurrirá a buscar epítopos muy conservados que inducen respuestas de anticuerpos neutralizantes «de amplio espectro» (Nabel 2013); alternativamente, pueden buscarse epítopos conservados que sean reconocidos por células T, de modo que si el patógeno esquiva la respuesta de anticuerpos pueda ser eliminado por la inmunidad celular (Iwasaki y Omer 2020). La predicción de epítopos B y T mediante técnicas apropiadas es de enorme utilidad para el diseño racional de vacunas (Sanchez-Trincado *et al.* 2017). Una aproximación fructífera a la identificación de potenciales antígenos y epítopos protectores es la «vacunología inversa», que, partiendo de la secuenciación del genoma completo de un patógeno, permite, mediante análisis computacional, predecir antígenos potenciales y sus epítopos que puedan inducir inmunidad protectora (Moxon *et al.* 2019; Brisse *et al.* 2020). Las actuales herramientas bioinformáticas permiten incluso predecir las energías y estructuras de interacción entre los antígenos potenciales y sus correspondientes anticuerpos (Brisse *et al.* 2020).

Otro desafío de la vacunología es el desarrollo de vacunas que induzcan inmunidad mucosal. Muchos patógenos acceden al medio interno a partir de la infección de mucosas, por lo que la inmunidad que implique al tejido linfoide asociado a las mucosas, que puede albergas células T de memoria, es capaz de crear una resistencia que impida el establecimiento de la infección desde su inicio (Iwasaki y Omer 2020). Las vacunas administradas a través de las superficies de la mucosa respiratoria son más potentes para promover la memoria inmunitaria local y las respuestas efectoras que las administradas por vía parenteral (Iwasaki y Omer 2020) y, por tanto, pueden proteger no solo frente a la enfermedad (definida como la manifestación sintomática o clínica de la infección) sino también frente a la infección (proliferación de patógenos en tejidos del hospedador), incluyendo las infecciones asintomáticas o subclínicas, lo que obviamente es un valor añadido, puesto que además de proteger cortan las posibles vías de contagio (Focosi *et al.* 2022). Adicionalmente, se han descrito diversos adyuvantes (muramil-dipéptido, flagelina, liposomas) efectivos en las vacunas diseñadas para administración a través de mucosas (Aoshi 2017). Las vías más comunes de administración a través de mucosas son la oral (para la mucosa intestinal) e intranasal (para la respiratoria), pero se están explorando la ocular, intravaginal e intrarrectal (Wallis *et al.* 2019).

Como dice Nabel (2013), las vacunas del futuro deben ir más allá del objetivo clásico de inducir una inmunidad que imite a la inmunidad natural inducida por la enfermedad, ya que han de superar las contramedidas que los patógenos utilizan para evitar los mecanismos

defensivos y que les permiten causar infecciones agudas graves, así como persistir en el hospedador estableciendo infecciones crónicas.

1.4. Tipos de vacunas

1.4.1. Vacunas de patógenos atenuados

Las vacunas atenuadas (también llamadas «vacunas vivas» o «vacunas de microorganismos vivos») contienen una versión del microorganismo vivo que no puede causar enfermedad pero que induce inmunidad protectora (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2015). Las mutaciones que causen alteración o inactivación de genes necesarios para el mantenimiento de la infección producen cepas avirulentas o con virulencia suficientemente disminuida, que pueden inocularse a individuos inmunocompetentes sin riesgo de causar enfermedad; si tales cepas atenuadas conservan la capacidad de inducir respuestas inmunes que protejan frente a la versión «silvestre» (virulenta) del patógeno, pueden utilizarse como cepas vacunales. En las vacunas clásicas, la atenuación se conseguía mediante sucesivos subcultivos del patógeno (ocasionalmente en determinadas condiciones alejadas de las fisiológicas); a lo largo de los subcultivos, se acumulan mutaciones que no están restringidas por factores del medio interno de un hospedador, por lo que se seleccionan los mutantes mejor adaptados a las condiciones de cultivo: en muchos casos esto conlleva la pérdida de factores de virulencia. Por ejemplo, la cepas de poliovirus de la vacuna Sabin presentan mutaciones en el sitio interno de entrada al ribosoma ubicado en la región no traducida (UTR) 5' de su genoma RNA; dichas mutaciones inhiben la traducción de la poliproteína viral en las neuronas, pero no en las células no neuronales en las que se propagaron dichas cepas hasta conseguir la pérdida de la neurovirulencia (Guest *et al.* 2004). Sin embargo, este procedimiento empírico para obtener cepas atenuadas es imprevisible y tiene el riesgo de que una nueva mutación suprima el efecto de la mutación atenuante y la cepa vacunal recupere la virulencia, como ya ha ocurrido con los virus revertientes designados como cVDPV («*circulating vaccine-derived polioviruses*»), responsables de brotes de poliomielitis en distintos países (https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/circulating-vaccine-derived-poliovirus-type-2-global-update). Los avances en la biología molecular de los virus han conducido a la identificación de genes esenciales para la replicación y el ensamblaje de la progenie viral; las mutaciones en este tipo de genes o su deleción permite obtener virus defectivos, que son incapaces de infección celular productiva, ya sea porque no pueden replicar sus genomas o porque tras la replicación no pueden completar el ensamblaje (estos últimos son los llamados «virus de ciclo único»); para su mantenimiento, estos candidatos a cepas vacunales se propagan en líneas celulares modificadas que expresan la(s) proteína(s) esenciales de las que ellos carecen (Lauring *et al.* 2010). Las vacunas atenuadas son generalmente muy inmunógenas, pero plantean dos clases de problemas de seguridad: la ya mencionada posibilidad de reversión a la virulencia, como consecuencia de mutaciones supresoras de las mutaciones atenuantes o de recombinaciones con otros virus; y el hecho de que puedan causar infecciones graves en hospedadores inmunocomprometidos, que no deben recibir este tipo de vacunas (Mekalanos 1994; Minor 2015; Vetter *et al.* 2018); tampoco es recomendable su administración a mujeres embarazadas, por el riesgo de transmisión transplacentaria (Vetter *et al.* 2018). Una revisión de las principales vacunas atenuadas actualmente en uso ha sido publicada por Minor (2015).

1.4.2. Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas (o «muertas») consisten en microorganismos enteros que, como consecuencia de un adecuado tratamiento físico o químico, han perdido la capacidad de proliferar o replicarse, pero conservan la inmunogenicidad de los antígenos protectores (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2015). Este procedimiento se aplicó por primera vez, a finales del siglo XIX, para preparar vacunas frente a las fiebres tifoideas, el cólera y la peste bubónica, pero se extendió a la prevención de otras enfermedades infecciosas, tanto bacterianas como virales (Plotkin 2014). Hay una diversidad de tratamientos útiles para la inactivación de patógenos; su aplicación a la obtención de vacunas requiere, por una parte, asegurar la esterilidad absoluta de la preparación, pero por otra es necesario que las proteínas antigénicas conserven su estructura lo suficiente para conservar la inmunogenicidad sin que se modifiquen los epítopos protectores (Elveborg *et al.* 2022). Un procedimiento clásico de inactivación, utilizado en vacunas bacterianas, ha sido el calentamiento a temperaturas suficientes para inactivar biomoléculas esenciales para el patógeno, los protocolos deben diseñarse individualmente para cada microorganismo, ya que las tasas de inactivación son muy variables. El tratamiento con psoralenos y luz ultravioleta de bacterias mutantes defectivas en mecanismos de reparación del DNA por escisión de nucleótidos permite obtener bacterias incapaces de dividirse pero que conservan actividad metabólica: estas bacterias han sido denominadas como «muertas pero metabólicamente activas» y, dado que inician la infección de forma similar a sus contrapartidas silvestres, inducen una inmunidad muy próxima a la producida como consecuencia de la infección natural (Brockstedt *et al.* 2005).

Cabe mencionar aquí que la expresión «muertas pero metabólicamente activas» parece contradictoria en sí misma; en realidad, se trata de bacterias «no viables», en el sentido de que no pueden dejar descendencia, y las vacunas que con ellas se preparen quizás debieran considerarse más apropiadamente entre las vacunas atenuadas.

El formaldehído y β-propiolactona han sido los métodos de inactivación más utilizados para vacunas de virus, pero presentan dos limitaciones: ambos están clasificados como sustancias oncogénicas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y, además, pueden afectar a epítopos superficiales, en detrimento de la adecuada inmunogenicidad del virus inactivado; adicionalmente, la inactivación por formaldehído es un proceso largo, que puede requerir varias semanas (Elveborg *et al.* 2022). La azida de 1,5-yodonaftilo es una molécula hidrofóbica fotoactiva que tras la exposición a ultravioleta produce enlaces covalentes a las proteínas virales en los dominios hidrofóbicos de las biomembranas, lo que lleva a la inactivación pero preservando epítopos superficiales (Elveborg *et al.* 2022). El peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) es un fuerte agente oxidante que causa daño genómico produciendo roturas de cadena simple o doble tanto en virus RNA como DNA, y tiene la ventaja de ser ambientalmente seguro (Elveborg *et al.* 2022). Finalmente, se ha propuesto a la irradiación gamma como posible método de inactivación para la producción de vacunas virales (Elveborg *et al.* 2022).

Las vacunas inactivadas no tienen las limitaciones de las atenuadas, ni el riesgo de recuperación de la virulencia, pero son menos inmunógenas, por lo que deben administrarse en pautas de varias dosis (Vetter *et al.* 2018).

1.4.3. Toxoides

Determinados tratamientos químicos pueden inactivar exotoxinas convirtiéndolas en toxoides, que carecen de toxicidad pero conservan las propiedades antigénicas de las toxinas originales. La inmunización con toxoides se aplicó ya en la década de los 20 a la prevención de enfermedades como el tétanos o la difteria (Plotkin 2014). Se han utilizado agentes inactivantes como el formaldehído o el peróxido de hidrógeno; más recientemente, se han obtenido toxinas inactivadas genéticamente, en las que una mutación altera la estructura de la toxina de forma que se pierde la toxicidad sin afectar a los epítopos que inducen anticuerpos neutralizantes (Robbins *et al.* 2005).

1.4.4. Vacunas subunidad

Esta denominación comprende aquellas vacunas consistentes en una fracción o macromolécula componente de un microorganismo patógeno, la cual es capaz de inducir inmunidad protectora, lo que incluye a las vacunas de polisacáridos capsulares y a las vacunas de proteínas o péptidos (Iwasaki y Omer 2020).

Polisacáridos

La cápsula, construida con polímeros extracelulares, es un factor de virulencia importante para algunas bacterias patógenas, y en estos casos constituye un antígeno protector, ya que los anticuerpos dirigidos contra ella promueven la eliminación de la bacteria por opsonización (Plotkin 2014). Las vacunas de primera generación frente a bacterias capsuladas se basaron en polisacáridos capsulares extraídos de ellas y debidamente purificados, pero mostraron escasa inmunogenicidad en adultos y prácticamente nula en niños, ello es debido a que los polisacáridos son antígenos timoindependientes, es decir, activan a las células B sin mediar cooperación de las células Th, lo que se traduce en respuestas modestas de inmunidad humoral, sin maduración de la afinidad de los anticuerpos, sin generación de memoria inmune y sin inducción de inmunidad celular (Vetter *et al.* 2018). Para superar estas limitaciones, se ha recurrido a vacunas de polisacáridos conjugados con proteínas transportadoras, de forma que los carbohidratos actúan como epítopos artificialmente acoplados a la proteína, la cual aporta sus propios epítopos de células T transformando la respuesta timoindependiente en una respuesta dependiente de células T, que induce anticuerpos de alta afinidad y memoria inmunológica (Vetter *et al.* 2018).

Proteínas

Muchos antígenos protectores son proteínas o glicoproteínas constitutivas de los microorganismos patógenos. Hay tres procedimientos para preparar vacunas que contengan solo antígenos protectores en lugar del patógeno entero: fraccionar el microorganismo y extraer y en su caso purificar dichos antígenos; identificar los genes que los codifican, clonarlos y obtener los antígenos como proteínas recombinantes; o, conocida la secuencia de aminoácidos del antígeno, sintetizar en el laboratorio péptidos que contengan los epítopos que inducen la inmunidad protectora (Francis 2018) (fig. 6). Las vacunas fraccionadas (conocidas también como «*split-product vaccines*») se elaboran a partir de virus inactivados y tratados con detergentes y técnicas fisicoquímicas de separación y purificación de los antígenos deseados; algunas vacunas frente a la gripe constituidas por hemaglutinina y neuraminidasa son un buen ejemplo (Verma *et al.* 2012).

La tecnología de DNA recombinante permite obtener proteínas para su uso como vacunas, siguiendo varias modalidades distintas (Francis 2018):

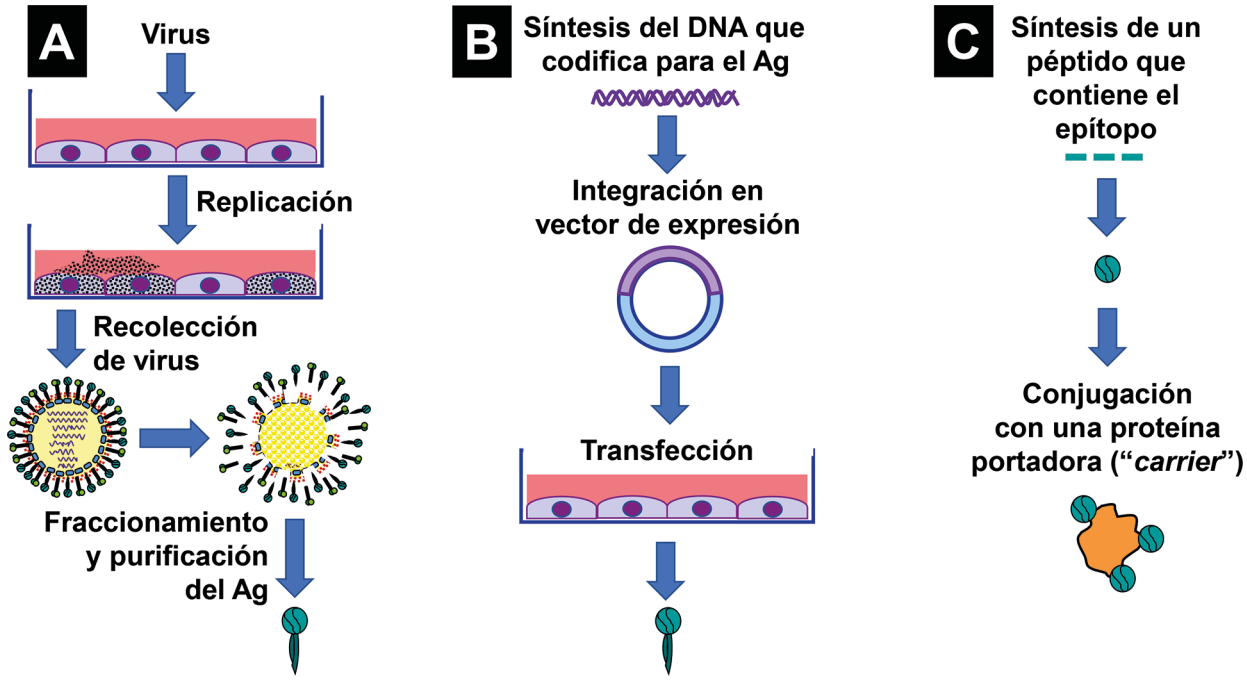


Figura 6. Preparación de vacunas subunidad proteínicas de un virus (en este ejemplo, virus de la gripe). **A**, cultivo, recolección, fraccionamiento del virus, extracción y purificación del antígeno protector. **B**, tecnología de DNA recombinante: síntesis del gen (o clonaje), integración en un vector de expresión, transfección de células de mamífero (en su caso, de bacterias, levaduras, células vegetales o de insectos), extracción y purificación del antígeno recombinantes así producido. **C**, síntesis *in vitro* de un péptido que contiene la secuencia íntegra del epítopo y conjugación del péptido con una proteína portadora (*carrier*) que aporta el tamaño molecular requerido para la inmunogenicidad

— Insertando el gen clonado en vectores de expresión que se introducen en bacterias, generalmente *Escherichia coli*; este procedimiento tiene la limitación de que las proteínas recombinantes producidas en procariotas pueden adoptar estructuras terciarias diferentes, especialmente en el caso de glicoproteínas (que se formarán sin glicosilar).
— Expresando el gen en levaduras: al tratarse de células eucariotas, las glicoproteínas se producirán glicosiladas, aunque el patrón de glicosilación puede diferir del original, lo cual podrá afectar o no a la conformación de los epítopos; *Saccharomyces cerevisiae* y *Pychia pastoris* son las levaduras más utilizadas y la vacuna del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) es un buen ejemplo.
— Expresando el gen en células de insectos: En el genoma de los baculovirus (virus con genoma DNA bicatenario pertenecientes a la familia *Baculoviridae* que son patógenos de insectos) hay un potente promotor de expresión que controla la producción de polihedrina (una proteína que forma la matriz en que se incluyen los viriones hijos liberados por las células infectadas); la infección de líneas celulares derivadas del ovario del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* con baculovirus en los que el gen de la polihedrina ha sido sustituido por el gen que codifica para el antígeno vacunal permite obtener grandes cantidades de este, aunque una vez más los patrones de glicosilación de las glicoproteínas así obtenidas no suele coincidir con el original.
— Introduciendo el gen en líneas celulares de mamífero para una expresión idónea en cuanto al plegamiento y patrones de glicosilación del antígeno; esta modalidad, que podría ser la ideal, plantea algunas dificultades técnicas.
— Introduciendo el gen en células vegetales: algunas plantas, como *Nicotiana benthamiana*, se están utilizando para la expresión de proteínas de interés biofarmacéutico, incluyendo candidatas a vacunas.

Finalmente, las vacunas de péptidos sintéticos se confeccionan de manera que contengan el o los epítopos cruciales para inducir inmunidad protectora; estos epítopos no siempre son los inmunodominantes, es decir, en un antígeno protector pueden concurrir varios epítopos, y los que inducen respuestas más potentes no necesariamente son los que inducen inmunidad protectora, por lo que el diseño de un péptido que solo contenga los epítopos protectores tiene la ventaja de focalizar la respuesta en ellos, eliminando la interferencia de los otros (Azmi *et al.* 2014; Malonis *et al.* 2020).

Sin embargo, dado que la inmunogenicidad guarda una relación con el tamaño molecular, los péptidos de pequeño tamaño suelen ser poco inmunógenos, por lo que es necesario acoplarlos a la superficie de proteínas que actúan como portadoras («carriers») y que, en su caso, aportan epítopos reconocidos por células Th; alternativamente, los péptidos pueden disponerse en formatos multiméricos (VLPs, nanopartículas) y asociados a adyuvantes (Malonis *et al.* 2020). Otras opciones consisten en conjugar los péptidos con ligandos agonistas de PRRs (generalmente, TLRs) o incluso con anticuerpos específicos para proteínas marcadoras de subpoblaciones de células dendríticas, para dirigir y focalizar los péptidos hacia estas células presentadoras de antígenos (Hos *et al.* 2018).

La pobre inmunogenicidad es una limitación común a las vacunas subunidad, por lo que requieren el uso de adyuvantes y pautas repetidas de administración (Azmi *et al.* 2014; Brisse *et al.* 2020). Tres enfoques efectivos para aumentar la inmunogenicidad son los ya mencionados formatos de liposomas, VLPs y nanopartículas (sección 1.3.2). Los liposomas pueden incluir péptidos vacunales encapsulados en sus núcleos acuosos, o insertados en las bicapas lipídicas, o incluso unidos a la superficie externa (Azmi *et al.* 2014), si bien esto última ubicación no es propicia para activar células T (Wallis *et al.* 2019). La presentación del antígeno se facilita ya que los liposomas son endocitados por las células presentadoras (células dendríticas, macrófagos) debido a su naturaleza de partículas (Azmi *et al.* 2014). De hecho, se ha descrito que los liposomas de mayor tamaño (por encima de 500 nm) favorecen las respuestas Th1 frente a los antígenos incorporados, mientras que los menores (por debajo de 200 nm) priman las respuestas Th2, debido a diferencias en el tráfico intracelular en las células presentadoras (Brewer *et al.* 2004; Mann *et al.* 2009). Las VLPs tienen un rango de tamaños similar al de los virus a los que imitan (entre 22 y 150 nm) y poseen una buena inmunogenicidad, incluso en ausencia de adyuvantes (Grgacic y Anderson 2006; Wallis *et al.* 2019); si conservan los ligandos virales correspondientes a los receptores celulares para el virus imitado, pueden ser incorporadas por las células diana de este, además de ser endocitadas por células dendríticas y macrófagos, lo que permite inducir tanto respuestas de anticuerpos como inmunidad celular (Grgacic y Anderson 2006; Brisse *et al.* 2020). En cuanto a las nanopartículas, definidas por su diámetro inferior a 100 nm, se producen entrecruzando químicamente antígenos proteicos y moléculas portadoras (orgánicas, generalmente lipídicas, o inorgánicas, mayoritariamente poliméricas) para aumentar la inmunogenicidad y disminuir la degradación de los antígenos (Brisse *et al.* 2020).

1.4.5. Vacunas vectorizadas por microorganismos

Estas vacunas están constituidas por microorganismos vivos (bacterias y virus) sin capacidad patogénica (por atenuación o por carecer naturalmente de ella), a los que mediante manipulación genética se han incorporado genes que codifican para antígenos protectores de un patógeno; se trata, por tanto, de vacunas recombinantes vivas (Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera 2015). Estos genes heterólogos se expresarán en el organismo del individuo vacunado y las propiedades inmunoestimuladoras del microorganismo vector (su contenido en PAMPs que generen señales de alerta y sus interacciones activas con el sistema inmune) harán las veces de adyuvante (Ding *et al.* 2018; Brisse *et al.* 2020).

Vectores bacterianos

Las bacterias patógenas más estudiadas como vectores de genes vacunales son cepas atenuadas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica* serovar Typhimurium; ambas son patógenas intracelulares, lo que facilita el que junto a las respuestas de anticuerpos se desarrolle también inmunidad celular. También se han propuesto cepas atenuadas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholera*, así como la cepa BCG de *Mycobacterium bovis*; y entre las bacterias no patógenas, cepas probióticas del grupo de «bacterias del ácido láctico» (lactobacilos) y de *Bacillus subtilis* (Ding *et al.* 2018). Usualmente, los genes heterólogos se introducen en la bacteria vector incorporados en plásmidos, lo que tiene el inconveniente de su posible inestabilidad, por lo que debe considerarse la opción de incorporarlos al cromosoma bacteriano; también es de suma importancia que, una vez sintetizadas, los antígenos protectores sean debidamente secretados y que no sean destruidos por proteasas de la bacteria vector (Ding *et al.* 2018; Lv *et al.* 2020).

Vectores virales

Los virus atenuados usados como vectores vacunales tienen la capacidad de sintetizar el antígeno foráneo intracelularmente, por lo que inducen respuestas inmunitarias humorales y celulares (fig. 7) e incluso inmunidad mucosal (Rollier *et al.* 2011). Esta forma de elaborar vacunas es especialmente útil en la prevención de enfermedades causadas por virus que no crecen bien *in vitro* (como el del papiloma humano o el de la hepatitis C); virus que presentan desafíos de seguridad durante el desarrollo de vacunas (un ejemplo sería el virus del Ébola); virus que pierden la infectividad debido a su inestabilidad física (es el caso del virus respiratorio sincitial); y virus que pueden intercambiar genes con virus circulantes (como ocurre con coronavirus, virus de la gripe y enterovirus) (Kim y Samal 2016). Los primeros diseños de

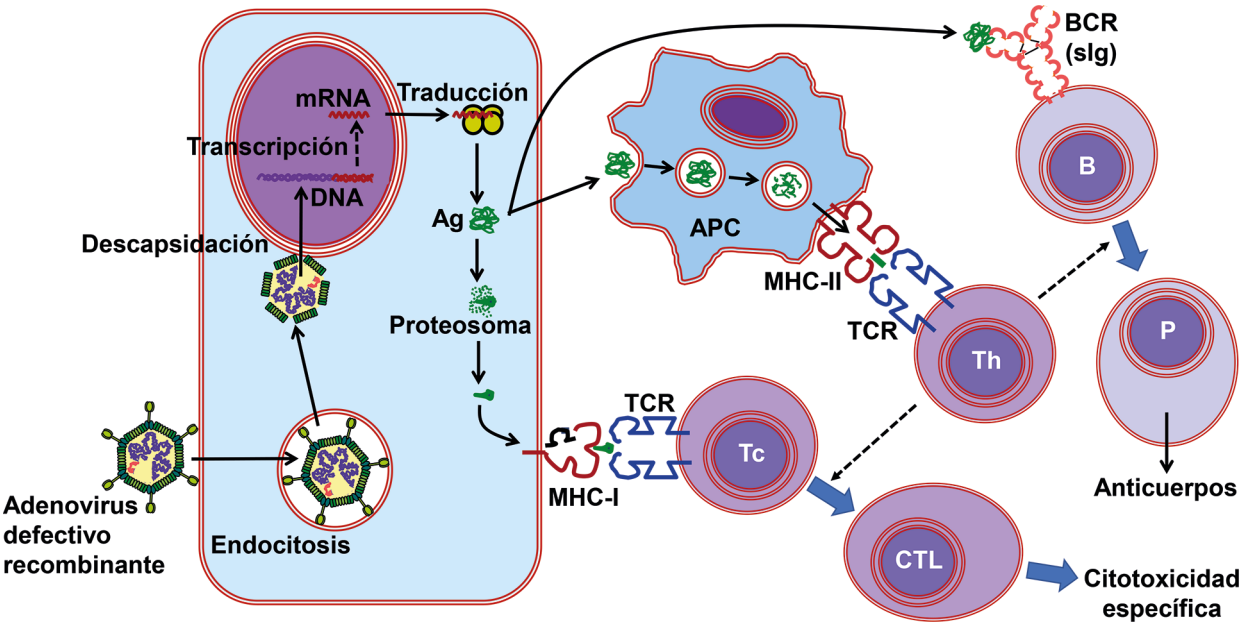


Figura 7. Inducción de inmunidad humoral (respuesta de anticuerpos) y celular (células T citotóxicas, Tc) por vacunas vectorizadas por virus. El virus recombinante infecta células del individuo vacunado. La Figura muestra el ejemplo de un vector adenoviral, que es endocitado, ocurre la descapsidación ante un poro de la doble membrana nuclear y el genoma viral accede al núcleo. El gen insertado en el genoma viral se transcribe, el RNA mensajero sale del núcleo, es traducido en los ribosomas y la célula sintetiza la proteína correspondiente (el antígeno protector, Ag); parte de las moléculas de antígeno siguen la vía de procesamiento de los antígenos endógenos, y algunos de los oligopéptidos generados en el proteosoma son presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) a las células T CD8+ (Tc) que reconocen el conjunto epítopo extraño + molécula MHC-I propia mediante su receptor (TCR), con lo que inician respuestas de inmunidad celular. Otras moléculas de antígeno son secretadas; unas serán reconocidas por el receptor de células B (BCR), formado por inmunoglobulinas de superficie (sIg), y otras endocitadas por células presentadoras de antígenos (APC), que las procesarán por la vía de los antígenos exógenos para presentarlas a células T CD4+ (Th), las cuales cooperarán con células B para su activación y diferenciación en plasmocitos (P) productores de anticuerpos, y con las células Tc para la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL). Las flechas discontinuas representan la cooperación, que puede requerir contacto célula-célula o bien ocurrir mediante la emisión de citocinas

vacunas vectorizadas por virus se realizaron con virus de genoma DNA y tamaño relativamente grande: miembros de las familias *Poxviridae*, *Herpesviridae* y *Adenoviridae*, pero los estudios se han extendido a virus RNA como *Togaviridae* (*Alphavirus*), *Flaviviridae* (virus West Nile Kunjin) y *Paramyxoviridae* (virus del sarampión y virus de la enfermedad de Newcastle) (Lundstrom 2019; Brisse *et al.* 2020).

Los poxvirus son virus de gran tamaño, con genoma DNA bicatenario de hasta 250 Kb (*Orthopoxvirus*) y 300 Kb (*Avipoxvirus*), lo que facilita las manipulaciones genéticas y la inserción de DNA foráneo. Es posible eliminar de su genoma más de 9 Kb sin afectar a su capacidad de replicación e insertar a cambio hasta 25 Kb, lo que equivale a varios genes heterólogos en un mismo vector (Francis 2018). El uso de poxvirus como vectores en vacunas comporta varias ventajas: son virus que se replican en factorías virales ubicadas el citoplasma de la célula infectada, lo que limita la posibilidad de integración del DNA viral en algún cromosoma celular, minimizando el riesgo de interrupción de genes del hospedador y de activación de protooncogenes; son capaces de inducir potentes respuestas, tanto de anticuerpos como de inmunidad celular, frente a los antígenos heterólogos; permiten la elaboración de vacunas liofilizadas estables, de fácil conservación; dado que la viruela fue erradicada y que la vacuna para su prevención dejó de utilizarse en la década de los 70, la prevalencia de anticuerpos frente a poxvirus que pudiesen neutralizar al vector de estas vacunas es muy baja; y tienen un amplio espectro de células diana (queratinocitos, fibroblastos, células presentadoras de antígenos) (García-Arriaza y Esteban 2014; Kaynarcalidan *et al.* 2021). De la cepa Ankara del virus *Vaccinia* (*Orthopoxvirus*) se obtuvo, tras un laborioso proceso de centenares de pases sucesivos en cultivo de fibroblastos de embrión de pollo, un derivado al que se denominó virus Vaccinia Ankara modificado (MVA, de «*Modified Vaccinia virus Ankara*») (Volz y Sutter 2017). Durante este proceso el virus acumuló hasta seis deleciones que resultaron en la pérdida de la capacidad de infección productiva en células de mamífero por bloqueo en la morfogénesis viral, pero sin interferir en la expresión génica y en la síntesis de proteínas, incluidas las codificadas por genes heterólogos, lo que la convierte en un vector idóneo para vacunas, como ha sido comprobado en numerosos ensayos preclínicos y clínicos (Volz y Sutter 2017; Kaynarcalidan

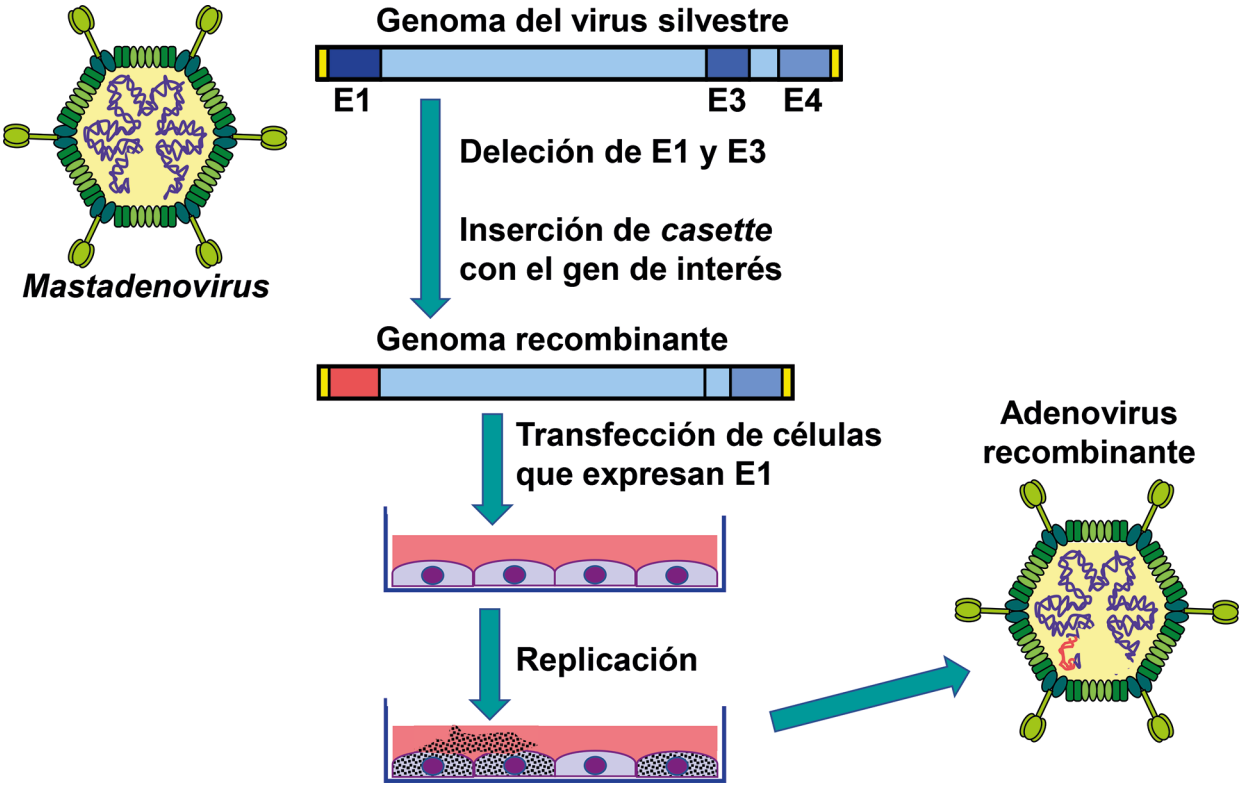


Figura 8. Elaboración de vacunas de vector adenoviral. El gen E1, que es imprescindible para la replicación del virus, es eliminado para generar virus defectivos incapaces de replicarse en células normales; la deleción de E3 es recomendable para aumentar la capacidad del vector para aceptar DNA extraño. En la Figura no se representan los genes estructurales. En el genoma recombinante E1 ha sido sustituido por una casete (en rojo) que incluye el gen que codifica para el antígeno protector. El virus recombinante se propaga en células manipuladas para que expresen E1, que le falta al virus pero sin el cual éste no podría replicarse

et al. 2021). Ulteriores manipulaciones génicas pueden mejorar el rendimiento como vector vacunal, por ejemplo eliminando genes responsables de efectos inmunomoduladores que pudieran afectar negativamente a las respuestas de los sujetos vacunados (García-Arriaza y Esteban 2014; Volz y Sutter 2017). También se han propuesto como vectores miembros del género *Avipoxvirus*, como el virus de la viruela aviar (*Fowlpox*), que son naturalmente incapaces de infección productiva en mamíferos (Weli y Tryland 2011); la facilidad para incorporar varios genes a un mismo vector ha sido aprovechada para insertar, junto con los genes heterólogos vacunales, genes que codifican para citocinas (IFN-γ, IL-12) que coadyuven a la mayor potencia de las respuestas (Coupar *et al.* 2006; García-Arriaza y Esteban 2014).

Aunque de un tamaño mucho menor al de los poxvirus, los adenovirus son también muy apropiados para actuar como vectores vacunales (fig. 8).

El genoma de los adenovirus de mamíferos (género *Mastadenovirus*) es un DNA bicatenario que no rebasa las 36 Kb, pero es susceptible de incorporar genes foráneos. La mayoría de los adenovirus humanos causan enfermedades leves (resfriado, gastroenteritis) en adultos inmunocompetentes, pero la seguridad de los vectores se garantiza por la deleción del locus E1, que elimina la capacidad de replicación viral (en consecuencia, para propagar estos virus defectivos *in vitro* han de utilizarse líneas celulares modificadas que aporten este gen en *trans*) y además evita la apoptosis, permitiendo una presentación duradera de antígenos; otra ventaja es que las vacunas vectorizadas por adenovirus pueden administrarse tanto sistémicamente como a través de superficies mucosas y su relativa termoestabilidad facilita su conservación (Tatsis y Ertl 2004; Dicks *et al.* 2012). La región E3 está implicada en el escape del virus a las defensas del hospedador (Lichtenstein *et al.* 2004); por tanto, es inútil en un vector vacunal y su deleción adicional permite insertar hasta casi 8 Kb de DNA foráneo sin afectar a la capacidad del adenovirus como vector (Tatsis y Ertl 2004; Dicks *et al.* 2012). Los adenovirus tienen un tropismo amplio hacia diversos linajes celulares, que además puede modificarse mediante manipulación genética consiguiendo vectores dirigidos a receptores de células presentadoras de antígenos (Tatsis y Ertl 2004). Los primeros diseños de vacunas usando adenovirus humanos como AdHu5 encontraron la limitación de que la seroprevalencia de anticuerpos frente a ellos es alta en la población sana, y estos anticuerpos neutralizan al vector disminuyendo

radicalmente su eficiencia; una solución es utilizar como vectores adenovirus de chimpancé (AdC), que dan buenos resultados de inmunogenicidad (Dicks *et al.* 2012; Gilbert y Warimwe 2017); alternativamente, se pueden usar adenovirus humanos de serotipos raros, como AdHu35, o el propio AdHu5 con la cápsida modificada (Rollier *et al.* 2011).

Se han propuesto como vectores vacunales virus con genoma RNA de polaridad positiva (misma secuencia de bases que los RNA mensajeros) y de polaridad negativa (secuencia de bases complementaria a las de los RNA mensajeros). Los RNAs genómicos se clonan en plásmidos mediante uso de retrotranscriptasa que genera DNA complementario (cDNA), lo que permite la manipulación genética (deleción de genes estructurales e inserción de genes foráneos); estos plásmidos son transfectados en células donde se producen los RNAs recombinantes y, en su caso, la progenie viral (Lundstrom 2020). En el caso de virus con RNA de sentido negativo, es necesario recurrir a procedimientos de genética inversa, en los que las células son transfectadas adicionalmente con plásmidos auxiliares que aportan las proteínas necesarias para la replicación del RNA viral (Conzelmann 1996). Dentro de la familia *Paramyxoviridae*, de virus con genoma RNA negativo, la especie *Avian orthoavulavirus 1*, perteneciente al género *Orthoavulavirus*, es el agente causal de la enfermedad de Newcastle (una infección respiratoria de las aves) y es un vector prometedor para vacunas humanas, ya que reúne las siguientes condiciones (Hu *et al.* 2020): su genoma, de unas 15 Kb, es fácil de clonar y manipular; puede aceptar un gen foráneo que se exprese de forma estable; se replica en el citoplasma, sin interaccionar con el material genético albergado en el núcleo celular; los riesgos de recombinación e intercambio de genes con otros virus son mínimos; el virus induce potentes respuestas de inmunidad humoral y celular, e incluso mucosal; dado que no causa infección natural en humanos, no hay anticuerpos preexistentes que puedan anular la eficacia de la vacuna. Las partículas de virus Newcastle recombinantes se obtienen por genética inversa y un solo vector plasmídico puede aceptar hasta 4,5 Kb de DNA foráneo, que se pasará al RNA viral y se expresará de forma estable (Choi 2017). Se trata de un vector muy seguro; las pocas infecciones reportadas por este virus en humanos son leves, pero además en la elaboración de vacunas se usan variantes avirulentas para evitar la transmisión accidental a aves de corral (Kim y Samal 2016; Choi 2017).

Algunos virus RNA de sentido positivo de los géneros *Alphavirus* y *Flavivirus* han demostrado ser vehículos interesantes para el desarrollo de vacunas, por su capacidad de autoamplificación del RNA. Por ejemplo, se han generado replicones del virus Kunjin (perteneciente a la especie *West Nile* de *Flavivirus*), a los que se denomina «replicones KUN», en los que se insertan genes foráneos y que pueden administrarse encapsidados, como partículas pseudoinfecciosas: las células infectadas *in vivo* no generan progenie viral, pero la autoamplificación del RNA en el citoplasma se traduce en un aumento significativo de la expresión del antígeno vacunal insertado sin que las células sufran efectos citopáticos (Varnavski *et al.* 2000; Harvey *et al.* 2003). Además de administrarlos como partículas virales recombinantes, los replicones de RNA viral pueden administrarse directamente como RNA desnudo o, alternativamente, en los plásmidos de clonaje (Harvey *et al.* 2003; Lundstrom 2020); en tales casos entrarían en los conceptos de vacunas RNA o DNA, que se abordan a continuación.

1.4.6. Vacunas DNA

En estas vacunas el vector es una molécula de DNA que contiene el o los genes que codifican para antígenos protectores. Estas vacunas consisten, por tanto, en DNA en forma de plásmidos bacterianos, minicírculos o construcciones minimalistas lineales, siempre cerrados covalentemente, que contienen al menos una casete de expresión en eucariotas que codifica para el antígeno vacunal; la casete de expresión consta de un promotor de transcripción funcional en células eucariotas, el gen del antígeno y una secuencia de señal poli(A) para acoplar la cola de poliadenilato al mRNA (Shafaati *et al.* 2022). Las vacunas de DNA plasmídico, generado generalmente en *Escherichia coli*, poseen un armazón o «esqueleto» de DNA bacteriano, con su origen de replicación y al menos un gen marcador, generalmente de resistencia a antibióticos; por diversos motivos, ese esqueleto bacteriano puede reducir el nivel de expresión de los genes vacunales en células de mamífero, lo que ha llevado a diseñar vectores mínimos de los que se ha eliminado el DNA plasmídico, como los minicírculos de DNA, en los que la recombinación intramolecular de un plásmido parental lo segrega en dos moléculas circulares, un minicírculo que contiene la casete de expresión eucariota y un plásmido menor que el original, que consiste en el esqueleto de DNA bacteriano; los minicírculos se separan, purifican y formulan como se haría para una vacuna plasmídica; o los «vectores MIDGE» (acrónimo de «*minimalistic, immunologically defined gene expresión*»), en los que, tras la digestión del plásmido, se ligan a los extremos del gen vacunal oligodesoxinucleótidos que se cierran covalentemente para formar una molécula de DNA en forma de mancuerna exenta del DNA plasmídico (Shafaati *et al.* 2022).

Expresión del DNA vacunal

Una vez administrado el DNA, debe ser incorporado por células y una vez dentro de ellas debe acceder al núcleo,

donde ocurrirá la transcripción para formar el correspondiente mRNA, que saldrá al citoplasma para ser traducido en los ribosomas. Por tanto, ha de superar dos barreras, la membrana citoplásmica y la doble membrana nuclear; pero el DNA plasmídico es una estructura muy distendida y cargada negativamente, que es propensa a la degradación en el compartimento extracelular y que carece de mecanismos adecuados para entrar en la célula y luego en el núcleo: por ello, el principal inconveniente de las vacunas de DNA es su baja inmunogenicidad debido a su escasa tasa de transfección (Faurez *et al.* 2010; Wallis *et al.* 2019). Se han ideado estrategias para mejorar el transporte del DNA desde el citoplasma al núcleo, como acoplarle secuencias de DNA viral que poseen señales de localización nuclear (NLS, de «*nuclear localization signal*»), las cuales se unen a factores de transcripción celulares para para aprovechar su capacidad de incorporarse al núcleo; alternativamente, se ha recurrido a unir directamente factores de transcripción como NF-κB al DNA vacunal (Faurez *et al.* 2010; Shafaati *et al.* 2022). Otra mejora interesante consiste en colocar en la casete de expresión promotores específicos de determinados linajes celulares, lo que permite restringir la expresión de los genes vacunales a ciertos tipos de células, como las células dendríticas presentadoras de antígenos (Shafaati *et al.* 2022).

Formulaciones para la administración de vacunas DNA

Las vacunas DNA pueden administrarse en formulaciones adyuvantes, que protejan al DNA de la degradación, como liposomas y nanopartículas; o asociados a adyuvantes moleculares agonistas de PRRs; incluso se hacen ensayos en los que la vacuna incorpora genes que codifican para citocinas inmunoestimuladoras. Las vías de administración son variadas: intramuscular, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intranasal, rectal; y los modos de administración incluyen la inyección, inyección seguida de electroporación, pistola de genes que dispara microproyectiles de oro, dispositivo motorizado con resorte para inyección sin aguja, supositorios, micropartículas de administración oral (Redding y Weiner 2009). La fabricación de vacunas DNA es más rentable que las de subunidad proteica, ya que el DNA se puede sintetizar mediante química escalable sencilla o producir en cultivos bacterianos a gran escala (Wallis *et al.* 2019), y no requiere instalaciones con alto nivel de bioseguridad (Redding y Weiner 2009). Otras ventajas de estas vacunas son su estabilidad, que facilita el almacenamiento y transporte; la ausencia de interferencia por anticuerpos preexistentes (por ejemplo, los adquiridos a través de la inmunidad pasiva transmitida de madre a hijo); y la inducción, no solo de respuesta de anticuerpos, sino también de inmunidad celular, ya que el DNA es incorporado por células propias del tejido inoculado (por ejemplo, miocitos), dentro de las cuales se sintetizan los antígenos que son procesados por la vía de antígenos endógenos, por lo que se presentan asociados a moléculas del MHC de clase I a las células Tc, pero también es incorporado por células auxiliares como los macrófagos, que expresan moléculas MHC de clase II y presentan a células Th (Redding y Weiner 2009; Faurez *et al.* 2010).

Seguridad

Las vacunas DNA se consideran seguras, en base a los resultados de numerosos estudios preclínicos y a la experiencia acumulada con vacunas usadas en veterinaria; sin embargo, se les ha achacado el riesgo de que el DNA foráneo pueda integrarse en cromosomas de la célula que lo ha incorporado, con posibles consecuencias de mutagénesis o alteraciones en la expresión de genes celulares contiguos al inserto; las investigaciones que han abordado este problema coinciden en que la probabilidad de integración es menor que la frecuencia de mutaciones espontáneas, pero esto debe ser debidamente documentado en cualquier nueva vacuna DNA propuesta (Faurez *et al.* 2010; Shafaati *et al.* 2022). El DNA foráneo libre es destruido por endonucleasas, mientras que el propio desarrollo de la respuesta inmune específica termina por destruir a las células que han incorporado y están expresando los genes vacunales (Faurez *et al.* 2010). Hay vacunas DNA en desarrollo para infecciones humanas por varios virus (papilomavirus humanos, virus Zika, virus Ebola, hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana), pero la vacuna ZyCoV-D frente a la COVID-19 ha sido la primera vacuna DNA aprobada para su uso en humanos (Shafaati *et al.* 2022).

1.4.7. Vacunas de mRNA

Las vacunas de mRNA consisten en una molécula de RNA mensajero que contiene la secuencia que codifica al menos para la parte esencial de un antígeno protector de un determinado patógeno. Este mRNA debe ingresar en células, en cuyo citoplasma es traducido por los ribosomas, que sintetizan la correspondiente proteína que será objeto de las modificaciones postranscripcionales apropiadas para generar una proteína correctamente plegada y completamente funcional (Pardi *et al.* 2018). Ya se ha comentado que la inmunización mediante transferencia de información genética, cuyo objetivo es conseguir que células del individuo inmunizado sinteticen los antígenos vacunales, tiene la ventaja de inducir tanto inmunidad humoral como celular (fig. 9B), además de que la fabricación de estas vacunas es más fácil que la de las vacunas tradicionales. En principio la atención se centró

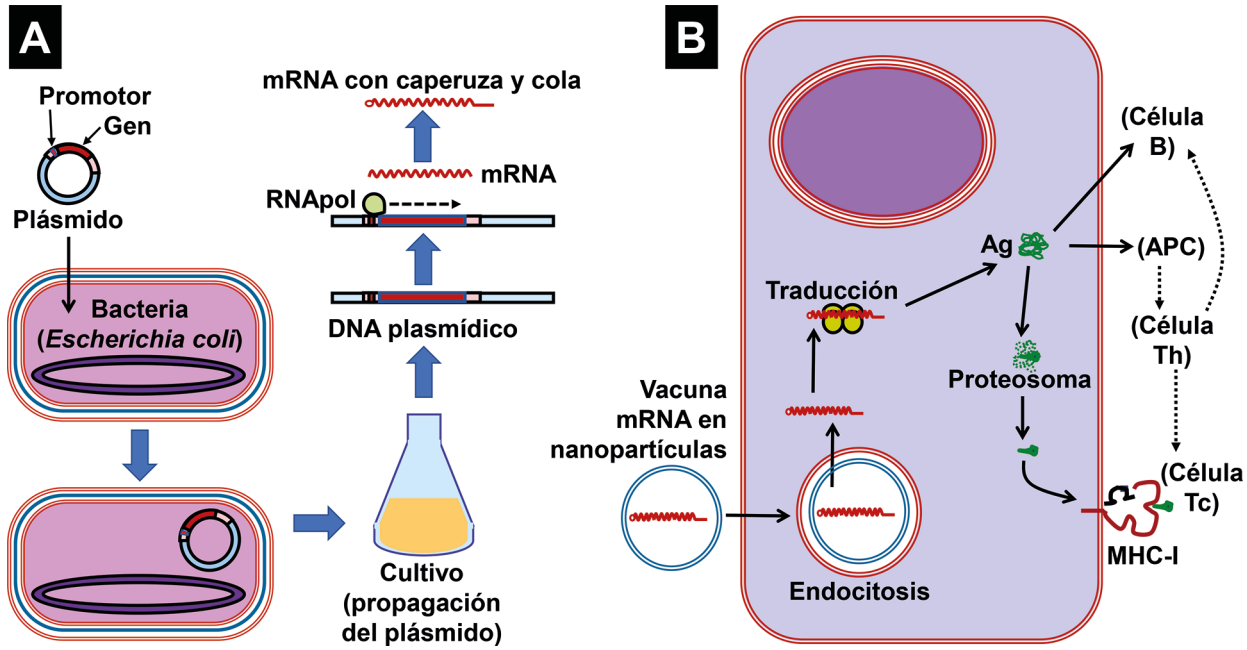


Figura 9. Vacunas de mRNA. **A**, elaboración: se construye un plásmido que contiene el gen que codifica para el antígeno protector; el plásmido se introduce en una bacteria (generalmente *Escherichia coli*) para propagarlo; el DNA plasmídico se extrae y se usa como molde para fabricar in vitro muchas copias de mRNA, que se purifican y se introducen en el vehículo apropiado (p. ej., nanopartículas lipídicas). **B**, una vez administrada la vacuna, el mRNA es incorporado por células y traducido en los ribosomas; el antígeno (Ag) es secretado y se unirá a células B o será endocitado por células presentadoras (APC) que lo procesarán por vía de los antígenos exógenos para presentarlo a células Th; otras moléculas de Ag serán procesadas por la vía de los antígenos endógenos y los oligopéptidos resultantes, asociados a moléculas MHC-I, se presentarán a células T citotóxicas (Tc). En consecuencia, se generarán respuestas de inmunidad humoral y celular, tal como se ilustra en la Figura 7 para el caso de vacunas vectorizadas por adenovirus

en candidatos de vacunas de DNA, significativamente más estable que el RNA, que es rápidamente degradado por RNasas intra- y extracelulares (Pardi *et al.* 2018; Liu 2019); pero la inmunogenicidad de las primeras vacunas DNA ensayadas no fue satisfactoria (entre otros factores está la dificultad de tener que atravesar dos barreras, la membrana citoplásmica y la nuclear) y esto, unido a los reparos sobre su posible integración en cromosomas celulares (riesgo que, sin embargo, se ha demostrado que es mínimo), impulsó el interés sobre las vacunas de mRNA, cuya ubicación es citoplásmica (Bloom *et al.* 2021).

Evolución de las vacunas de mRNA

La historia de las vacunas de mRNA se inicia en los años 80 y 90, cuando distintos investigadores mostraron que el mRNA exógeno podía ser incorporado por células y traducido a proteínas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Dolgin 2021). Pero a la mencionada limitación que supone la inestabilidad del mRNA se añadió la observación de fuertes reacciones inflamatorias cuando se administraba a animales de experimentación (Dolgin 2021). Estas reacciones se deben al carácter inmunomodulador del RNA exógeno, que una vez endocitado pasa al endosoma donde puede ser detectado por los PRRs endosomiales TLR7 y TLR8, así como a impurezas y contaminantes procedentes del proceso de síntesis del RNA *in vitro*, entre ellas fragmentos de RNA bicatenario; además de causar inflamación, hay inducción de interferones de tipo I, que inhiben la traducción y promueven la degradación de los mRNAs, lo que obviamente interfiere con el mecanismo de acción de la vacuna (Pardi *et al.* 2018; Jackson *et al.* 2020b). Pronto se establecieron dos procedimientos para superar este problema: uno, la modificación química de los nucleótidos de uridina para convertirlos en pseudouridina o metil-pseudouridina, lo que impide el reconocimiento por PRRs (Kariko *et al.* 2008); y otro, la eliminación de contaminantes mediante técnicas muy eficientes de purificación del RNA vacunal (Kariko *et al.* 2011). Ambos procedimientos, no excluyentes entre sí, han sido cruciales para el éxito de esta plataforma de producción de vacunas, y al deprimir las respuestas de inmunidad innata, y en especial la inducción de interferones, se incrementan notablemente los niveles de expresión de las proteínas codificadas por el mRNA exógeno (Pardi *et al.* 2018; Liu 2019; Jackson *et al.* 2020b). Katalin Kariko trabajaba en el equipo de Drew Weissman, en la Universidad de Pensilvania en Filadelfia, y la trascendencia de la aportación de ambos, revalorizada por el desarrollo de vacunas de mRNA que han tenido un papel decisivo en la prevención de la COVID-19, ha sido reconocida con la

adjudicación compartida del Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 2023 (Callaway y Naddaf 2023).

A pesar de estos adelantos, la proporción de moléculas de mRNA que evitan la degradación endosomial y acceden a los ribosomas es muy baja, lo que impone un límite a la eficiencia de la traducción (Liu 2019). Para contrarrestar esta limitación, se han propuesto otras alternativas. Una es la circularización del RNA, inspirada en la existencia en células eucariotas de RNAs circulares, algunos de los cuales tienen capacidad codificante; al carecer de extremos libres, evitan la acción de las exorribonucleasas, lo que prolonga significativamente su vida útil (Wesselhoeft *et al.* 2018). Otra ha sido el desarrollo de las vacunas de mRNA autoamplificante, consistentes en un mRNA que codifica para el antígeno vacunal y para una maquinaria de replicación procedente de un virus RNA; esta maquinaria incluye la RNA-polimerasa dependiente de RNA necesaria para la replicación intracelular del RNA exógeno y genera un gran número de copias, lo que permite una mayor producción de antígeno a partir de dosis muy pequeñas de vacuna (Pardi *et al.* 2018; Jackson *et al.* 2020b). Las vacunas que contienen RNA autoamplificante pueden administrarse como replicones recombinantes encapsidados (partículas virales pseudoinfecciosas), ya mencionados al tratar de las vacunas vectorizadas por virus, o como RNA desnudo; en este caso, suelen consistir en un genoma de *Alphavirus* en el que se han conservado los genes que codifican para la maquinaria de replicación, pero los genes que codifican para proteínas estructurales han sido reemplazados el antígeno de interés (Pardi *et al.* 2018; Bloom *et al.* 2021). Las vacunas de RNA autoamplificante desnudo tienen, respecto de las vectorizadas por partículas pseudoinfecciosas, la ventaja de carecer de una cápsida de proteínas virales antigénicas, que provocarían respuestas inmunitarias inútiles e incluso perjudiciales para las dosis de refuerzo que usasen el mismo vector, además de evitar pérdidas de eficacia debidas a una posible inmunidad preexistente frente al virus vector (Bloom *et al.* 2021).

Elaboración de vacunas de mRNA

La producción de vacunas de mRNA (fig. 9A) se inicia con la construcción de un plásmido que incluya un promotor de RNA-polimerasa dependiente de DNA seguido de la secuencia codificadora del antígeno vacunal, flanqueada por las correspondientes secuencias no traducidas (UTR, de «*untranslated region*») en los extremos 5' y 3', y eventualmente una cola de poliadenilato en el extremo 3'; en el caso de que el antígeno vacunal pertenezca a un virus RNA, la secuencia codificadora se puede obtener como cDNA (DNA complementario) mediante la acción de una retrotranscriptasa. Este DNA plasmídico se propaga en bacterias (la más utilizada es *Escherichia coli*) y se utiliza como plantilla para la producción de RNA *in vitro*; si la cola de poliadenilato en 3' no estaba codificada en el plásmido, se añade al RNA mediante reacción enzimática, y se confecciona también la caperuza («*cap*») de metilguanosina en el extremo 5', para conseguir una perfecta configuración de mRNA eucariótico; se elimina el molde de DNA mediante digestión con DNasa y se somete el RNA sintetizado a las adecuadas fases de purificación (Pardi *et al.* 2018; Liu 2019; Bloom *et al.* 2021). Las regiones UTR 5' y 3' son importantes para optimizar la expresión génica; la caperuza se requiere para una traducción eficiente y protege al mRNA de la degradación y del reconocimiento por la inmunidad innata; también la cola de poliadenilato estabiliza al mRNA (Jackson *et al.* 2020b).

Como se ha indicado anteriormente, los replicones con los que se construyen las vacunas de RNA autoamplificante se pueden administrar también como DNA plasmídico, es decir, como vacunas de DNA (Lundstrom 2020); se ha encontrado que las vacunas experimentales con plásmidos que contienen la maquinaria de replicación de alfavirus requieren un millar de veces menos DNA que las vacunas con plásmidos convencionales para conseguir respuestas inmunitarias similares (Lundstrom 2021).

Se han ensayado diversas formulaciones para la administración de vacunas de mRNA. La inyección intradérmica o intraganglionar de RNA desnudo es efectiva, ya que facilita su incorporación por células presentadoras de antígeno; el uso de microproyectiles de oro recubiertos de RNA descargados a través de la piel mediante pistola de genes y la electroporación *in vivo* también han sido utilizados (Pardi *et al.* 2018). La encapsulación del RNA en nanopartículas (< 100 nm) lipídicas (LNP, de «*lipid nanoparticles*») ha emergido como una de las formas de administración más prometedoras, ya que asegura la protección del RNA frente a su degradación extracelular, permite dirigirlo hacia determinados tejidos o linajes celulares, facilita su incorporación por células y una vez internados, los LNPs promueven el escape del compartimento endosomial incrementando así las probabilidades de traducción en los ribosomas (Jackson *et al.* 2020b). Una formulación de LNPs muy utilizada incluye cuatro componentes: un lípido catiónico ionizable, que promueve el autoensamblaje y permite la liberación del RNA desde el endosoma al citoplasma; polietilenglicol ligado a lípidos, que aumenta la vida media de las formulaciones; colesterol como agente estabilizador; y fosfolípidos naturales, que sustentan la estructura de la bicapa lipídica (Pardi *et al.* 2018).

Seguridad y eficacia

Las vacunas de mRNA se consideran seguras, ya que carecen de capacidad para infección productiva, no acceden al núcleo celular con lo que no hay riesgo potencial de

mutagénesis por inserción en cromosomas, y el mRNA exógeno es finalmente degradado (Pardi *et al.* 2018). Sin embargo, se han publicado recientemente algunos reportes indicando la posible captura del RNA de SARS-CoV-2, y en concreto del mRNA de vacunas frente a la COVID-19, por un retrotransposon que lo integra en un cromosoma, lo que supondría un riesgo potencial que será discutido en la sección 3.10.4.

Se han publicado datos de ensayos preclínicos con varias vacunas candidatas a ser usadas en humanos, frente al virus de la inmunodeficiencia humana, el virus respiratorio sincitial, el virus Zika, el virus Ebola y el de la rabia; pero las primeras, y hasta ahora únicas vacunas de mRNA autorizadas para su uso son las dirigidas a la prevención de la COVID-19 (Bloom *et al.* 2021).

2. INMUNIDAD FRENTE A LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

2.1. Respuesta de anticuerpos

En el curso de la infección natural por SARS-CoV-2 se producen anticuerpos específicos para distintos antígenos del virus; estos anticuerpos pertenecen a las tres clases principales de inmunoglobulinas, IgM, IgG e IgA; algunos son capaces de neutralizar la infectividad del virus, es decir, se producen anticuerpos neutralizantes y anticuerpos no neutralizantes (Cromer *et al.* 2021; Zeng *et al.* 2021). Los anticuerpos neutralizantes reconocen epítopos en el RBD de la proteína S, impidiendo su unión al receptor celular ACE2, y se ha descrito que alcanzan sus niveles máximos entre tres y cinco semanas después de la infección; el resto de anticuerpos que se unen a otras regiones de S o a otras proteínas virales no son neutralizantes, lo que no significa que sean inútiles, ya que pueden contribuir al control de la infección mediando la eliminación del virus libre o la destrucción de las células infectadas a través de mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células, ya sean linfocitos citotóxicos inespecíficos (células «*natural killer*») o macrófagos (Cromer *et al.* 2021). En la COVID-19 no se ha observado la presencia de anticuerpos facilitadores de la infección, como tampoco antes en los brotes de SARS y de MERS (Sette y Crotty 2021).

2.1.1. Técnicas de determinación de anticuerpos

Si bien las técnicas de detección de secuencias génicas específicas, tipo PCR, han constituido desde el principio la referencia para el diagnóstico de laboratorio de la infección por SARS-CoV-2, pronto se vio la necesidad de disponer de técnicas serológicas de determinación de anticuerpos específicos útiles en el diagnóstico retrospectivo, el seguimiento de la respuesta inmunitaria, la vigilancia de brotes y rastreo de contactos, los estudios de cribado y seroprevalencia, y la posible determinación de los intervalos de vacunación (Vandenberg *et al.* 2021; Filchakova *et al.* 2022). Las primeras pruebas serológicas que se aplicaron a estos fines fueron técnicas de inmunocromatografía («*lateral flow assay*») y de inmunoenzimoensayo en fase sólida (ELISA), que detectaban anticuerpos específicos para las proteínas S y N, en algunos casos identificando el isotipo (clases IgM, IgG e IgA); a ellas se han ido agregando otras técnicas de mayor sensibilidad, como los ensayos de quimioluminiscencia, ensayos con microperlas sensibilizadas y anti-gamma-globulinas marcadas con fluorocromos o con metales y ensayos con diversos biosensores (Datta *et al.* 2021; Dogan *et al.* 2021; Filchakova *et al.* 2022; Zhou *et al.* 2022). Los antígenos usados son proteínas (principalmente la S o su fragmento RBD) producidas por tecnología de DNA recombinante en bacterias, levaduras, células de insectos, células de mamíferos o células vegetales, siendo preferidos los sistemas en los que las modificaciones posttraducción (glicosilación, plegamiento) conservan la misma especificidad en sus epítopos que la exhibida en el curso de la infección natural (Makatsa *et al.* 2021). Sin embargo, estos procedimientos detectan todos los anticuerpos específicos contra los antígenos de prueba, sin discriminar cuales de ellos son capaces de neutralizar la infección. Las pruebas de neutralización consisten en evaluar la capacidad de los anticuerpos problema para interferir con la infección de un cultivo de células susceptibles (que expresen niveles adecuados del receptor ACE2), lo que requiere utilizar virus activos y, en consecuencia, un laboratorio de nivel de bioseguridad 3 (Tan *et al.* 2020). Una alternativa es el uso de pseudovirus, lo que rebaja los requisitos de bioseguridad: por ejemplo, vectores lentivirales que poseen un gen marcador («*reporter*») como el que codifica para la proteína fluorescente RFP («*red fluorescent protein*») y que a su vez expresan la proteína S, que se ensayan sobre cultivos de una línea celular humana manipulada para sobreexpresar ACE2 (Dogan *et al.* 2021). Incluso se ha diseñado una prueba totalmente segura en la que una fase sólida de poliestireno similar a las usadas en la pruebas ELISA se sensibiliza con ACE2, y se mide la capacidad de los anticuerpos problema para interferir con la unión de RBD conjugado con un enzima que convierte un sustrato sintético en compuesto coloreado (Tan *et al.* 2020).

2.1.2. Correlación entre respuesta de anticuerpos y gravedad de la infección

El análisis de las respuestas de anticuerpos en enfermos de COVID-19 ha planteado algunas aparentes contradicciones, revelando la complejidad de las interacciones

entre el SARS-CoV-2 y el sistema inmune. Ya en los primeros estudios se observó que los pacientes de COVID-19 con presentación clínica grave desarrollan una potente respuesta de anticuerpos, mientras que en las infecciones leves por SARS-CoV-2 la respuesta de anticuerpos es moderada (Rijkers *et al.* 2020). Esta correlación entre la magnitud de la respuesta de anticuerpos (incluyendo las tres clases de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA) y la gravedad de la enfermedad ha sido confirmada reiteradamente (Hendriks *et al.* 2022). Lo que resulta aún más intrigante, es que la correlación se mantiene cuando se investigan solo los anticuerpos neutralizantes, que en teoría debieran resultar protectores (Cromer *et al.* 2021); en este mismo sentido, los pacientes hospitalizados tienen títulos de anticuerpos neutralizantes muy superiores a los detectados en pacientes ambulatorios o en convalecientes (Dogan *et al.* 2021). Como posible explicación se ha señalado que en los casos graves la carga viral es más alta y, en consecuencia, el estímulo antigénico también (Choteau *et al.* 2022). Sin embargo, la situación es más compleja. Es frecuente que la evolución clínica del COVID-19 grave empeore alrededor de una a dos semanas después de la aparición de los síntomas, como consecuencia de la «tormenta de citocinas proinflamatorias», que curiosamente coincide en el tiempo con la aparición de la respuesta de anticuerpos específicos (Hoepel *et al.* 2021). Todo ello hace pensar que la respuesta de anticuerpos (aunque incluya anticuerpos capaces de neutralizar la infección *in vitro*) no es suficiente para evitar el desarrollo de las formas graves de COVID-19; de hecho, en pacientes con agammaglobulinemia la infección por SARS-CoV-2 ha seguido un curso leve en ausencia de tratamientos (Quinti *et al.* 2020; Choteau *et al.* 2022). La ausencia de correlación entre la respuesta de anticuerpos neutralizantes y la recuperación de los pacientes sugiere que esta requiere la participación de los linfocitos T (Sette y Crotty 2021; Choteau *et al.* 2022), al menos en la primoinfección; los anticuerpos neutralizantes tendrían un papel relevante en la inmunidad protectora frente a las reinfecciones (Sette y Crotty 2021).

Pero además, algunas evidencias apuntan a un posible efecto perjudicial de algunos anticuerpos. En este sentido, hay observaciones contradictorias sobre al papel de los anticuerpos de la clase IgA: por una parte, se ha reportado que su actividad neutralizante es significativamente más potente que la de los anticuerpos de clase IgG (Zeng *et al.* 2021), pero su presencia en enfermos graves sugiere un posible papel inmunopatológico: la IgA es una potente activadora de mecanismos proinflamatorias de la inmunidad innata y en concreto la activación de neutrófilos mediada por anticuerpos IgA podría ser un componente importante de la patología grave en la COVID-19 (Bartsch *et al.* 2021). También los anticuerpos de clase IgG pueden asociarse a efectos deletéreos: se ha descrito que la primera ola de anticuerpos IgG específicos para la proteína S presentan un patrón inusual de glicosilación, con proporciones bajas de fucosa y altas de galactosa, que a través de su unión al FcγRIII (un receptor celular para la porción inespecífica carboxilo-terminal de la IgG) activarían la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6), participando así en la tormenta de citocinas (Hoepel *et al.* 2021). Un aspecto importante por considerar es la afinidad (fuerza de unión al antígeno) de los anticuerpos: sabido es que a lo largo de la respuesta inmunitaria hay un proceso de maduración de afinidad, dependiente de las células Th foliculares, que selecciona a los subclones de células B productores de anticuerpos con mayor afinidad por el antígeno (ver sección 1.1.2). Se ha observado que los pacientes con COVID-19 grave poseen títulos altos de anticuerpos neutralizantes, pero de baja afinidad; en los casos fatales la maduración de afinidad es mínima, pero en los que sobreviven hay un aumento gradual de la afinidad, que es aún mayor en los pacientes que no requieren hospitalización (Tang *et al.* 2021; Hendriks *et al.* 2022). Por tanto, parece que la mayor gravedad de la infección por SARS-CoV-2 se asocia a un bloqueo de la maduración de afinidad posiblemente relacionado con una función deficiente de las células Th foliculares (Tang *et al.* 2021). Se ha postulado que en los pacientes graves, el bloqueo de la maduración conduce a la producción de anticuerpos con baja afinidad y por tanto, con escasa eficacia en la neutralización del virus, por lo que la carga viral aumenta y en consecuencia también el estímulo antigénico que induce títulos más elevados de estos anticuerpos ineficaces (Hendriks *et al.* 2022). La incapacidad para controlar la carga viral y los mecanismos inmunopatológicos activados por los anticuerpos ineficaces (activación del complemento, activación de células a través de los FcγR) contribuirán al estado hiperinflamatorio típico de los enfermos graves de COVID-19 (Hendriks *et al.* 2022). En conclusión, la escasa afinidad y la glicosilación aberrante de los primeros anticuerpos producidos tras la seroconversión serían factores determinantes de la mala evolución clínica en los casos graves de COVID-19 (Hoepel *et al.* 2021; Hendriks *et al.* 2022).

2.1.3. Duración de la respuesta de anticuerpos

El tiempo de persistencia de anticuerpos que puedan suministrar inmunidad protectora tras una primera infección por SARS-CoV-2 es un dato de gran importancia, tanto a efectos epidemiológicos para conocer la posible incidencia de reinfecciones como a la hora de establecer pautas de inmunización vacunal. Se sabe que la inmunidad frente a otros coronavirus humanos, causantes de

infecciones respiratorias estacionales (generalmente, resfriado común) es de corta duración, ya que las reinfecciones son frecuentes pasados 12 meses de la infección inicialmente diagnosticada (Edridge *et al.* 2020). Un estudio realizado con sueros de individuos recuperados de la COVID-19 tras el primer brote en Wuhan y no reinfectados ni vacunados posteriomente ha mostrado que un años después de la infección se conservan niveles efectivos de anticuerpos neutralizantes frente a la cepa original, si bien la eficacia disminuyó frente a algunas variantes portadoras de mutaciones críticas en el fragmento RBD de la proteína S (Liu *et al.* 2022a).

2.2. Inmunidad celular

También las respuestas de las células T en los enfermos de COVID-19 son complejas y han suscitado interpretaciones contradictorias. Aunque las respuestas van dirigidas a los distintos péptidos de origen viral, predominan la respuestas específicas frente a péptidos de la proteína S, si bien en algunos pacientes se observan respuestas derreguladas y excesivas que contribuyen a la patogénesis (Toor *et al.* 2021).

Las publicaciones al respecto coinciden mayoritariamente en adjudicar un papel crucial de las células T en la protección inmunitaria frente al SARS-CoV-2. Se ha reportado que la respuesta temprana de células T específicas se asocia con manifestaciones clínicas leves y rápida eliminación del virus (Wagner *et al.* 2022); en estos pacientes leves las células T están elevadas y protagonizan una respuesta antiviral robusta, al contrario de los enfermos graves (Sette y Crotty 2021; Toor *et al.* 2021), y cuando los pacientes que se han recuperado se examinan transcurrido un tiempo suficiente desde el inicio de los síntomas se obtienen recuentos de células T más altos y respuestas de células T antivirales mejoradas (Adamo *et al.* 2021). Incluso en ausencia de anticuerpos neutralizantes eficaces, una respuesta robusta de células T productoras de interferón tipo II (IFN-γ) podría ser suficiente para proporcionar protección inmunitaria contra el SARS-CoV-2 (De Candia *et al.* 2021). De hecho, se han propuesto patrones contrapuestos para las respuestas humoral y celular: en los enfermos graves hay una respuesta rápida y potente de anticuerpos, mientras que la inmunidad celular parece débil; lo contrario se observa en los pacientes leves, cuya respuesta de células T específicas, secretoras de IFN-γ, es rápida y potente, y se asocia con una eficiente eliminación del virus (Tan *et al.* 2021). En cuanto a la duración de la protección, se han detectado células T específicas hasta 12 meses después de la infección (Wagner *et al.* 2022).

Por el contrario, uno de los hallazgos típicos en los enfermos graves de COVID-19 es la linfopenia, que afecta a todas las subpoblaciones de células T (Caldrer *et al.* 2021) y más intensamente a los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos (Chen y John Wherry 2020; Mathew *et al.* 2020). La pérdida de células T $CD8^+$ es especialmente significativa, ya que en modelos experimentales anula la protección contra la reexposición al virus (Wagner *et al.* 2022). Se han invocado distintos mecanismos como causantes de la linfopenia: el secuestro de linfocitos en el tejido pulmonar, cuya infiltración por estas células (junto con neutrófilos y macrófagos) se demuestra en biopsias y necropsias, así como en el lavado broncoalveolar (Toor *et al.* 2021); y su depleción por muerte inducida por la citocina proinflamatoria IL-6 (De Candia *et al.* 2021).

Sin embargo, hay algunos informes que contradicen la correlación entre disminución de células T y gravedad de la COVID-19 (Thieme *et al.* 2020; Georg *et al.* 2022). Tal vez un factor a considerar en estas discrepancias sea el hecho de que las células T en enfermos graves de COVID-19 se encuentran en un estado de activación superior al de individuos sanos o con enfermedad leve (Adamo *et al.* 2021). Esta hiperactivación parece afectar, no solo a clones específicos, sino también a otros no relacionados con antígenos del virus, que se activarían por mecanismos inespecíficos, independientes del TCR, como la acción de la fracción C3a del sistema del complemento, activado a su vez por inmunocomplejos (Georg *et al.* 2022). Esto es coherente con la depleción de células T reguladoras (Treg) observada en los enfermos graves, lo que lleva a respuestas descontroladas y explicaría la hiperactivación de las células T $CD8^+$ en estos pacientes (De Candia *et al.* 2021; Toor *et al.* 2021). Son ilustrativas las diferencias observadas en las células del lavado broncoalveolar de pacientes con COVID-19 moderado y de pacientes graves y críticos; en el primer grupo hay una expansión de clones específicos de células T $CD8^+$, mientras que en los pacientes graves y críticos existe una activación de clones heterogéneos acompañados de macrófagos proinflamatorios (Liao *et al.* 2020). Evidentemente, las interacciones entre SARS-CoV-2 y la inmunidad celular son complejas, pero parece claro que en la COVID-19 grave hay fuertes perturbaciones de la homeostasis y la función de las células T periféricas, en comparación con los casos de enfermedad leve (Adamo *et al.* 2021).

3. VACUNAS FRENTE A LA COVID-19

3.1. Consideraciones generales

A la hora de diseñar una nueva vacuna, hay que plantearse varias cuestiones cruciales: la selección del antígeno o antígenos protectores; el tipo de vacuna (lo que actualmente se conoce como la «plataforma») y, en consecuencia, el poder inmunógeno, que determinará la

conveniencia de incluir adyuvantes en la formulación; la vía de inoculación y el régimen (carga de las dosis, número de inoculaciones e intervalo entre ellas) (Jeyanathan *et al.* 2020).

3.1.1. Antígenos protectores

Como se indicó en la Introducción de este capítulo, el desarrollo de vacunas para la prevención de la COVID-19 se benefició de la investigación previa sobre vacunas frente a SARS y MERS, y uno de los resultados bien establecidos en estas investigaciones fue la capacidad de la proteína S, y en concreto del RBD para actuar como antígeno protector (Dong *et al.* 2020). Se comprobó que las mutaciones, aparecidas en variantes del virus, que disminuyen sensiblemente la afinidad de los anticuerpos neutralizantes se localizan en sitios concretos del motivo de unión del RBD al receptor ACE2 (Greaney *et al.* 2021). Varios estudios se centraron en mapear en el RBD epítopos reconocibles por células B y por células T (Zhang *et al.* 2020), ya que pronto se reconoció que las respuestas de ambas poblaciones de linfocitos son cruciales para obtener una vacuna eficaz (Jeyanathan *et al.* 2020).

La necesidad de asegurar las respuestas de células T (cooperación e inmunidad celular) ha llevado a considerar la utilidad de incluir otros antígenos en las futuras vacunas, partiendo del hecho de que la infección por SARS-CoV-2 induce respuestas potentes de células T $CD4^+$ no solo frente a S, sino también frente a las proteínas M y N (además de algunas proteínas no estructurales como Nsp3 y Nsp4) y de células T $CD8^+$ principalmente frente a S y M (Dong *et al.* 2020). Obviamente, estas consideraciones no se refieren a las vacunas clásicas con virus entero inactivado o atenuado, ya que en estas están presentes todos los antígenos estructurales del virión. Algunos investigadores han propuesto que la presencia junto a S (o el RBD) de otras proteínas como N permitiría construir vacunas que indujesen respuestas equilibradas tanto de inmunidad humoral como celular (Jeyanathan *et al.* 2020). Al respecto, es interesante mencionar que los anticuerpos específicos para la proteína N han mostrado capacidad protectora frente al SARS-CoV-2: los inmunocomplejos que estos anticuerpos forman al unirse a N son endocitados y reconocidos por TRIM21, una ligasa citosólica de ubiquitina con receptor para Fc de IgG; la proteína N ubiquitinada es degradada por el proteosoma y, siguiendo la misma vía de procesamiento de los antígenos endógenos (presentación cruzada), algunos de los péptidos resultantes se asocian a moléculas del MHC de clase I para ser presentados a células T citotóxicas (T $CD8^+$); es decir, la respuesta de anticuerpos anti-N es protectora porque contribuye a la respuesta de inmunidad celular (Albecka *et al.* 2021).

3.1.2. Ensayos preclínicos: modelos de infección experimental

La constatación de la eficacia de los antígenos protectores y toda la investigación preclínica necesaria para definir las dosis y protocolos de la administración de una vacuna en desarrollo requieren de la disponibilidad de modelos de infección experimental; en un modelo ideal, la vía de inoculación debe coincidir con la ruta de infección natural; en su diseminación por los tejidos del hospedador experimental el patógeno debiera exhibir tropismo por los mismos tejidos diana que en el hospedador natural; las interacciones con las defensas y la evolución, sintomatología y gravedad del proceso infeccioso deben ser similares en el hospedador natural y el experimental. A esto hay que añadir la preferencia por animales manejables (de pequeño tamaño), de coste no excesivo (tanto en producción como en mantenimiento) y respuesta biológica homogénea (a ser posible, disponibilidad de razas puras, constituidas por animales homocigotos) (Ruiz-Bravo y Avilés 2022).

El ratón de laboratorio (*Mus musculus*), que ofrece una diversidad de razas puras homocigotas y para el cual se han comercializado gran número de inmunorreactivos, es uno de los animales más utilizados en investigación, pero es escasamente susceptible a la infección por SARS-CoV o SARS-CoV-2, ya que la ACE2 murina no tiene suficiente afinidad por el RBD de la proteína S; por ello, se desarrollaron ratones transgénicos para la ACE2 humana (hACE2), que fueron utilizados en investigaciones sobre el SARS-CoV (McCray *et al.* 2007) y que posteriormente, han demostrado ser un buen modelo para la COVID-19 humana, ya que cuando son infectados por SARS-CoV-2 desarrollan neumonía intersticial con infiltración de macrófagos y linfocitos y expresión de antígenos virales en células epiteliales bronquiales y alveolares (Bao *et al.* 2020). En estos ratones «humanizados» la vejez es un factor de riesgo para una mayor gravedad de la enfermedad, paralelamente a lo que ocurre en humanos (Johansen *et al.* 2020).

El hámster dorado sirio (*Mesocricetus auratus*) es uno de los animales naturalmente susceptible a SARS-CoV (Roberts *et al.* 2005), y como cabía esperar (ya que ambos virus se unen al mismo receptor ACE2), también lo es a SARS-CoV-2: la cinética viral, los cambios histopatológicos, las respuestas inmunitarias y la presentación clínica de la infección con SARS-CoV-2 en los hámsteres sirios son muy similares a los descritos en muchos pacientes con COVID-19, lo que los convierte en modelos experimentales útiles sin necesidad de ninguna manipulación genética (Chan *et al.* 2020; Johansen *et al.* 2020). Además, se ha demostrado la transmisión espontánea del SARS-CoV-2 por vía aérea y por contacto entre

hámsteres (Jeyanathan *et al.* 2020; Johansen *et al.* 2020). También el hurón (*Mustela putorius*) posee un ACE2 con afinidad suficiente por el RBD para permitir la infección por SARS-CoV-2, pero en estos animales los niveles de virus en el pulmón son bajos y el curso de la enfermedad es leve (Jeyanathan *et al.* 2020; Johansen *et al.* 2020).

Por su proximidad filogenética, cabría pensar que entre los primates no humanos deberían existir especies susceptibles a la infección por SARS-CoV-2. En efecto, se ha encontrado que los monos catarrinos (africanos y asiáticos), incluyendo a los grandes simios orangutanes, gorilas, bonobos y chimpancés, tienen la secuencia de 12 aminoácidos del sitio de unión de ACE2 a S similar a la humana, por lo que se infiere que deben ser susceptibles a la infección (Melin *et al.* 2020). En concreto, el macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) es un buen modelo experimental de la infección por SARS-CoV-2: los animales muestran altas cargas virales en el tracto respiratorio (tanto en el superior como en el inferior); hay evidencia patológica de neumonía viral, aunque el curso de la enfermedad es moderado, pero se agrava en los animales viejos (comportamiento similar al de la COVID-19 en humanos); y hay respuestas tanto de inmunidad humoral como celular, que confieren una protección significativa frente a las reinfecciones (Johansen *et al.* 2020).

3.1.3. Plataformas

La masiva respuesta de laboratorios y compañías farmacéuticas a la demanda de vacunas frente a la COVID-19 ha incluido diseños en todas las plataformas conocidas: virus entero, ya sea atenuado o inactivado; vacunas subunidad; vacunas vectorizadas por virus; vacunas de ácidos nucleicos (DNA y mRNA); a las que se han añadido otras tecnologías inusuales como las vacunas basadas en la administración de células presentadoras de antígenos modificadas y las basadas en esporas bacterianas que expresan antígenos virales en sus cubiertas (WHO, *COVID-19 vaccine tracker and landscape*, https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines).

3.1.4. La autorización por EUL

Como se ha indicado anteriormente, la OMS establece un procedimiento de autorización de emergencia (EUL, de «Emergency Use Listing Procedure») para evaluar y, en su caso, acelerar la disponibilidad recursos como medicamentos y vacunas en situaciones de emergencia de salud pública, que precede a su aprobación definitiva (Cavaleri *et al.* 2021). Este procedimiento se aplica a vacunas, terapias y pruebas de diagnóstico *in vitro*, que cumplan cuatro criterios: estar destinados a una enfermedad grave o con potencial epidémico o pandémico; las vacunas y medicamentos existentes no pueden erradicar la enfermedad o prevenir los brotes; la fabricación del producto cumple las buenas prácticas de manufactura o los sistemas de gestión de calidad vigentes; y el solicitante se compromete a completar el desarrollo del producto y solicitar la calificación de la OMS una vez obtenida la licencia (https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/eul).

Como se ha mencionado en la Introducción, la OMS ha incluido 12 vacunas en la lista de las autorizadas según el procedimiento de emergencia (*Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process*, actualización de fecha de 8 de agosto de 2023; https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document_files/Status_COVID_VAX_08AUgust2023.pdf). En las secciones que siguen se aporta información sobre cada una de ellas.

3.2. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas de mRNA

La urgencia de la demanda de vacunas que impuso la pandemia de COVID-19 proporcionó la oportunidad de aplicación a las nuevas tecnologías de vacunas de mRNA, que han mostrado sus ventajas de simplicidad y rapidez de producción, fácil industrialización, flexibilidad para responder a las nuevas variantes y la capacidad de inducir una mejor respuesta inmune (Fang *et al.* 2022). Como señalan Corbett *et al.* (2020a), la producción de líneas celulares y subunidades de proteína de grado clínico suele tardar más de un año, mientras que la fabricación de vacunas de ácido nucleico se puede realizar en cuestión de semanas.

3.2.1. Comirnaty (Pfizer/BioNTech)

La colaboración de las compañías farmacéuticas BioNTech (Biopharmaceutical New Technologies) y Pfizer ha desarrollado cinco vacunas basadas en mRNA con nucleósidos modificados por sustitución de la uridina por N1-metil-pseudouridina (BNT162b1, BNT162b2, BNT162b3), mRNA no modificado (BNT162a1) y mRNA autoamplificante (BNT162c2). Las candidatas BNT162b1 y BNT162b2 (fig. 10), administradas en LNPs de cuatro componentes (lípido catiónico, polietilenglicol, colesterol y fosfolípidos, ver sección 1.4.7) por vía intramuscular, fueron las primeras de las que se publicaron resultados de ensayos clínicos. BNT162b1 es un mRNA que codifica para el RBD de la proteína S, fusionado con el dominio de trimerización de la fibritina del fago T4 (utilizado para estabilizar trímeros), y se demostró su seguridad e inmunogenicidad (Mulligan *et al.* 2020) y su capacidad para

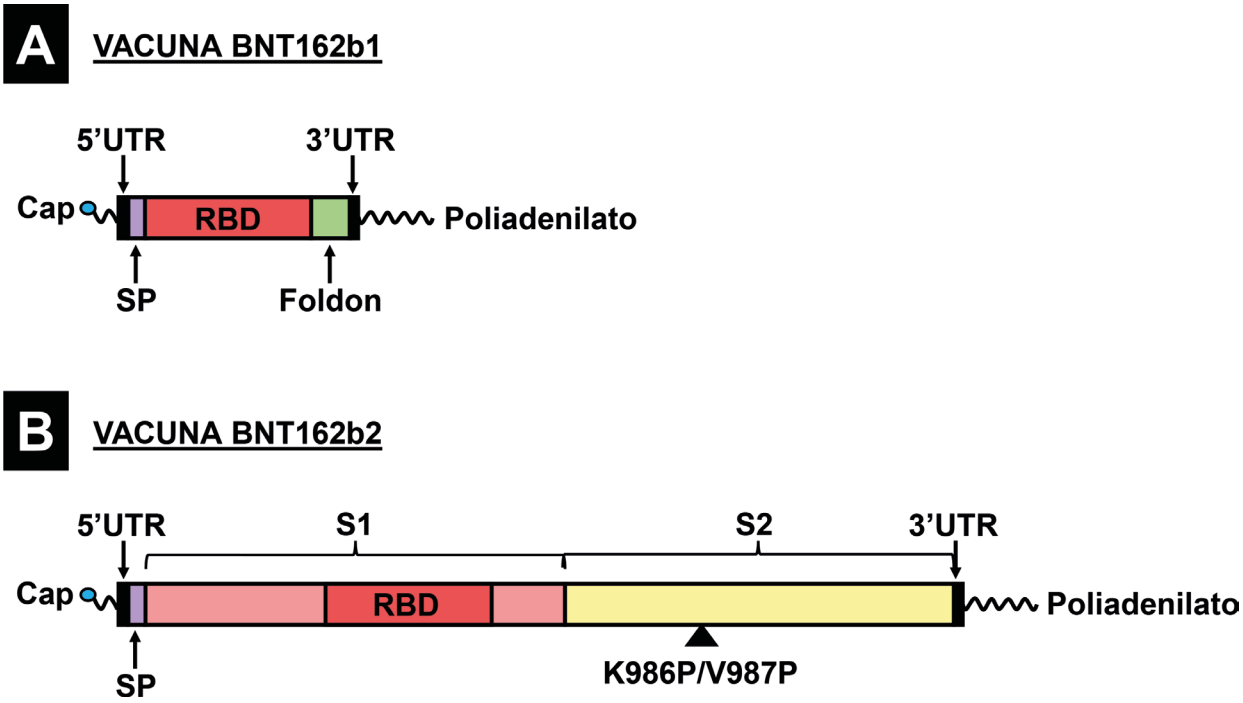


Figura 10. Vacunas mRNA de Pfizer/Biontech frente a la COVID-19. **A**, la vacuna BNT162b1 codifica solo para el RBD (dominio de unión al receptor), que se ha fusionado con «foldon» (el dominio de trimerización de la fibritina del fago T4) para estabilizar la forma trimérica de la proteína resultante. **B**, la vacuna BNT162b2 codifica para la proteína S entera; en la parte S2 se han introducido mutaciones para sustituir por prolina (P) los aminoácidos en las posiciones 986 (originalmente lisina, K) y 987 (originalmente valina, V), con el objetivo de estabilizar la proteína en la conformación de prefusión. SP es el péptido señal, necesario para la translocación de la proteína al retículo endoplásmico y posterior secreción. UTR designa a las regiones del mRNA no traducidas

inducir potentes respuestas de anticuerpos y de inmunidad celular (Sahin *et al.* 2020). BNT162b2 codifica para la proteína S completa (incluyendo las dos subunidades S1 y S2), en la que se han introducido dos mutaciones, sustituyendo los aminoácidos 986 y 987 por prolina (S-2P), para estabilizarla en la configuración de prefusión (Walsh *et al.* 2020; Vogel *et al.* 2021), y habiendo demostrado la inducción de respuestas inmunitarias similares a las de BNT162b1, fue preferida a esta por su menor reactogenicidad (especialmente en personas mayores), por lo que se la seleccionó para los subsiguientes ensayos clínicos en fases avanzadas (Walsh *et al.* 2020; Polack *et al.* 2020).

El uso de la proteína S como antígeno protector plantea el problema de su configuración espacial. En primer lugar, existen dos conformaciones alternantes: una, denominada «cerrada» o «abajo», mantiene el RBD ubicado en S1 oculto por azúcares, mientras que en la otra, «abierta» o «arriba», el RBD queda accesible y puede unirse a su receptor ACE2; en ambos casos, la proteína tiene una configuración global de «prefusión», pero cuando se establece la unión al receptor, pasa al estado de «posfusión» para mediar la fusión de la envoltura viral con las membranas celulares. Ahora bien, en la proteína purificada la configuración de prefusión es inestable y diversos estímulos pueden promover la transición al estado de posfusión (Xiong *et al.* 2020). Pero la conformación de posfusión expone epítopos inmunodominantes no neutralizantes que distraen al sistema inmunitario del huésped (Cai *et al.* 2020). Por ello, es conveniente que la proteína S que se produzca en las células que incorporan el mRNA vacunal esté estabilizada en la configuración de prefusión. Hay varias maneras de conseguir esto; la experiencia previa con los virus SARS-CoV y MERS-CoV reveló una de ellas: la sustitución de dos determinados aminoácidos consecutivos en la región central helicoidal de la subunidad S2 (lo que se conoce como mutaciones 2P) mantiene a la proteína en el estado de prefusión (Fang *et al.* 2022). En el caso de SARS-CoV-2, la lisina en posición 986 y la valina en posición 987 son los aminoácidos sustituídos por prolina (Vogel *et al.* 2021; Fang *et al.* 2022). Estudios estructurales sugieren que algunas mutaciones adicionales (mayoritariamente sustituyendo aminoácidos en determinadas posiciones por prolina) aumentan significativamente la estabilidad de S en prefusión (Hsieh *et al.* 2020; Juraszek *et al.* 2020), lo que debiera tenerse en consideración al diseñar futuras vacunas.

Las pruebas iniciales en ratones no humanizados demostraron la respuesta de anticuerpos con capacidad neutralizante *in vitro* y las respuestas de células T $CD4^+$

productoras de IFN-γ y de células T $CD8^+$ citotóxicas y productoras de IFN-γ y de IL-2; los ensayos en macacos Rhesus corroboraron la inducción de anticuerpos neutralizantes y de inmunidad celular, siendo destacable el sesgo de la respuesta hacia células de la subpoblación Th1 en detrimento de Th2 (lo que, como ya se ha comentado en la Introducción, es un rasgo favorable); finalmente, se demostró que la vacuna protegía a los macacos de la infección experimental con SARS-CoV-2, incluyendo la limitación de la presencia de RNA viral en el tracto respiratorio inferior (Vogel *et al.* 2021).

A la vacuna BNT162b2 se asignó el nombre genérico Tozinameran (la OMS acordó, en 2016, aplicar el sufijo -meran a todas las vacunas de mRNA) y el comercial de Comirnaty™ (Hogan y Pardi 2022). Fue autorizada en Europa el 22 de diciembre de 2020. De acuerdo con la ficha técnica disponible en CIMA (Centro de información *online* de medicamentos de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios), Comirnaty se administra por vía intramuscular en una pauta primaria de 2 dosis, de 30 µg cada una, con un intervalo de tres semanas; el período de validez de la vacuna almacenada en el margen de temperaturas de -60 °C a -90 °C es de un año, aunque los viales cerrados se pueden conservar y transportar entre -15 °C y -25 °C durante un período único máximo de 2 semanas para volver a conservarlos en las condiciones anteriores (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1201528004/FT_1201528004.pdf).

Se han reportado distintos porcentajes de eficacia para esta vacuna; en un estudio con más de 44.000 participantes de más de 16 años, que recibieron la pauta de dos dosis de 30 µg, con un intervalo de 21 días, o placebo, la protección frente a la COVID-19 sintomática durante un período de seis meses fue del 91,3 %, porcentaje que se elevó al 96,7 % en protección frente a enfermedad grave (definida por neumonía, síndrome respiratorio agudo grave, fallo multiorgánico o muerte), mientras que los efectos adversos consistieron mayoritariamente en reacciones locales (dolor leve a moderado en el lugar de la inyección), fiebre, cansancio o malestar general, concluyéndose que el perfil de seguridad fue favorable (Thomas *et al.* 2021). La ficha técnica de Comirnaty, ya citada, indica una protección global del 91,3 % frente a la enfermedad sintomática, protección que se elevó al 94,5 % en mayores de 65 años y al 96,2 % en mayores de 75. Un análisis de la respuesta de anticuerpos en individuos sometidos a la pauta de dos dosis demostró que tras la primera dosis la respuesta se inicia con anticuerpos frente a la subunidad S2, mayoritariamente de clase IgA (lo que se interpreta como una respuesta secundaria), y al final del intervalo de 21 días se detecta la respuesta de IgG frente a epítopos de S1; los niveles de IgG e IgA específicos para S1 y en concreto para el RBD se potencian considerablemente, enfatizando la importancia de la segunda dosis para alcanzar una protección eficiente (Brewer *et al.* 2022). La respuesta secundaria tras la primera dosis se atribuyó a reacciones cruzadas con la subunidad S2 de otros beta-coronavirus, ya que S2 presenta pocas variaciones entre los beta-coronavirus patógenos del ser humano (Ladner *et al.* 2021).

3.2.2. Spikevax (Moderna)

La empresa Moderna, dedicada desde 2010 al desarrollo de medicamentos basados en mRNA (el nombre de la empresa combina las palabras «*modified*» y «*RNA*» para confluir en «*modern*»), inició, apenas cinco días después de la publicación de la secuencia genómica del SARS-CoV-2, la investigación de una vacuna de mRNA modificado (mRNA-1273) para la proteína S entera, estabilizada en la conformación de prefusión mediante mutaciones 2P y administrada en LNPs; los ensayos clínicos en fase I de mRNA-1273 se iniciaron el 16 de marzo de 2020, tras una fase de investigación preclínica (Corbett *et al.* 2020a,b). La inmunogenicidad se examinó en ratones, obteniendo respuestas de anticuerpos con actividad neutralizante en ensayos con pseudovirus, y respuestas de células T $CD4^+$ con perfil predominante de Th1 y de células T $CD8^+$; para evaluar la inmunidad protectora, los ratones testigos e inmunizados con mRNA-1273 se desafiaron con un virus SARS-CoV-2 adaptado al ratón (es un virus que contiene mutaciones en el RBD las cuales permiten su unión al receptor ACE2 murino), comprobándose que mRNA-1273 confiere protección frente a la infección en todo el tracto respiratorio (Corbett *et al.* 2020a). La potente respuesta de anticuerpos neutralizantes, la respuesta de células Th1 y la protección frente a la infección experimental fueron reproducidos en ensayos con macacos Rhesus (Corbett *et al.* 2020b). Los resultados de los primeros ensayos clínicos mostraron que la pauta de dos dosis de 100 µg separadas por un intervalo de 28 días provocaron respuestas de anticuerpos neutralizantes, de células T $CD4^+$ con fuerte predominio de Th1, y respuestas bajas de células T $CD8^+$ (Jackson *et al.* 2020a).

El nombre genérico de mRNA-1273 es Elasomeran, y el comercial Spikevax™ (Hogan y Pardi 2022). Fue autorizada en Europa el 6 de enero de 2021. La ficha técnica disponible en CIMA indica una pauta dos dosis de 100 µg cada una por vía intramuscular, con un intervalo de 28 días entre ambas; los viales conservados entre -15 °C y -25 °C tienen un período de validez de nueve meses y pueden almacenarse, cerrados, entre 8 °C y 25 °C durante 24 horas (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1201507001/FT_1201507001.pdf).

Los datos que se manejan actualmente indican que esta vacuna ha mostrado una eficacia del 92,7 % en la prevención de COVID-19 sintomática y del 95,9 % en la prevención de la hospitalización, siendo fatiga, dolor de cabeza, artralgias, mialgias y dolor en el lugar de la inyección los efectos adversos más comunes (Wallace *et al.* 2022). La ya citada ficha técnica de Spikevax recoge datos de protección frente la COVID-19 (independientemente de la gravedad) del 94,1 %.

3.3. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas de vector adenovirus

3.3.1. Vaxzevria (Oxford/AstraZeneca) y Covishield (Serum Institute of India)

A principios de 2020, investigadores del Instituto Jenner, de la Universidad de Oxford, y la empresa Vaccitech (una «spin-off» de dicha Universidad) comenzaron a trabajar en el diseño de una vacuna frente a la COVID-19, utilizando un vector derivado del adenovirus Y25; se trata de un serotipo de la especie *Human mastadenovirus E*, aislado de chimpancé, que rara vez infecta a humanos. El vector, denominado inicialmente ChAdY25, carece de las regiones génicas E1, que es esencial para la replicación (por tanto, es un virus defectivo) y E3, para aumentar el espacio de inserción de DNA foráneo (ver los adenovirus como vectores virales en la sección 1.4.5 y las figs. 7 y 8); tras algunas manipulaciones adicionales para optimizar su uso en ensayos clínicos, el vector pasó a denominarse ChAdOX1 (Dicks *et al.* 2012). La seroprevalencia de anticuerpos frente al adenovirus Y5 es nula en Reino Unido, si bien en países donde el contacto con el virus es posible, como ocurre con Gambia, puede incrementarse hasta el 9 % (Dicks *et al.* 2012); esta información es importante, ya que la presencia previa de anticuerpos que reconozcan antígenos del vector limitará significativamente la eficacia de la vacuna. El Instituto Jenner y Vaccitech llegaron a un acuerdo con la compañía AstraZeneca para el desarrollo y producción de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19, insertando en el vector ChAdOX1 una *casette* viral con la secuencia que codifica para la proteína S natural (van Doremalen *et al.* 2020). Se demostró la inmunogenicidad en ratones y en macacos Rhesus, con inducción de anticuerpos neutralizantes y de inmunidad celular sesgada hacia células Th1, y protección frente a la infección pulmonar en macacos Rhesus (van Doremalen *et al.* 2020). Los resultados de los primeros ensayos clínicos en adultos de 18 a 55 años mostraron que una dosis única de ChAdOx1 nCoV-19 indujo respuestas de anticuerpos y de células T, mientras que tras la segunda dosis aseguró la presencia de anticuerpos neutralizantes en todos los participantes en el ensayo, aunque no mejoró significativamente la inmunidad celular (Folegatti *et al.* 2020). El análisis de la respuesta celular inducida por la dosis única corroboró el sesgo hacia Th1 y la generación de células T $CD8^+$ citotóxicas (Ewer *et al.* 2021). La comparación de los efectos de una pauta de dos dosis en varios grupos de edad reveló que la inmunogenicidad de ChAdOx1 nCoV-19, incluyendo tanto la producción de anticuerpos como la respuesta de células T (medida por la producción de IFN-γ), no se ve afectada significativamente por la edad (Ramasamy *et al.* 2021). Un ensayo en fase III con 32.451 individuos, de los cuales 21.635 recibieron la vacuna (dos dosis con una separación de cuatro semanas) mostró una eficacia del 74 % en la prevención de la enfermedad sintomática, del 94,2 % en la prevención de la hospitalización y del 100 % en la prevención de enfermedad crítica con ingreso en UCI (Falsey *et al.* 2021). Otro estudio subrayó la importancia del intervalo de tiempo entre las dos dosis: una separación inferior a seis semanas obtuvo una eficacia de solo el 55,1 %, mientras que cuando la separación fue de al menos 12 semanas, la eficacia se elevó al 81,3 % (Voysey *et al.* 2021). Aunque la eficacia de una dosis única se mantuvo elevada durante al menos 90 días tras la inmunización, la segunda dosis potenció significativamente los niveles de anticuerpos neutralizantes, por lo que se admite su conveniencia para conseguir una protección duradera (Voysey *et al.* 2021).

La vacuna ChAdOx1 nCoV-19, también denominada AZD1222, tiene como nombre genérico «AstraZeneca COVID-19 Vaccine», y como nombre comercial Vaxzevria™. Su fecha de autorización en Europa fue el 1 de febrero de 2021. La ficha técnica depositada en CIMA indica una pauta de dos dosis de al menos $2,5 \times 10^8$ unidades infecciosas cada una, administradas por vía intramuscular y separadas por un intervalo de cuatro a 12 semanas; los viales se conservan entre 2 °C y 8 °C, durante un máximo de seis meses (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1211529001/FT_1211529001.pdf). La ficha técnica reconoce una eficacia global del 74 % frente a la enfermedad sintomática; curiosamente, en el colectivo de mayores de 65 años la eficacia se eleva al 83,5 %. Un acuerdo entre AstraZeneca y el Serum Institute of India llevó a este a comercializar la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 bajo el nombre Covishield™, también autorizada por el procedimiento EUL aunque por ahora no por EMA.

Una característica discutible de esta vacuna es el uso de la secuencia natural que codifica para la proteína S, sin introducir mutaciones que aseguren la estabilidad de la conformación de prefusión. Como ya se ha comentado al tratar de las vacunas de mRNA, la configuración de prefusión es preferible para una eficiente inducción de anticuerpos neutralizantes, pero es metaestable, por lo que se ha recurrido a estabilizarla mediante la introducción

de sustituciones de algunos aminoácidos por prolina, como ocurre con las mutaciones 2P. De hecho, la comparación de hasta siete vectores recombinantes basados en un adenovirus humano (Ad26) defectivo, cada uno de los cuales expresaba una versión diferente de S, demostró que la versión 2P superaba en inmunogenicidad a todas las otras (incluyendo la versión natural), tanto en ratones (Bos *et al.* 2020) como en macacos Rhesus (Mercado *et al.* 2020), lo que llevó al desarrollo de la actual vacuna Ad26.COV2-S de la compañía farmacéutica Janssen; en el mismo sentido, ensayos con versiones de la proteína S, administradas como vacuna subunidad a ratones humanizados para ACE2, evidenciaron la superior capacidad protectora de la versión 2P en comparación con otras, incluida la natural (Amanat *et al.* 2021). El uso de la versión natural, no estabilizada, de la proteína S podría explicar la aparentemente menor eficacia de ChAdOx1 nCoV-19 en relación con otras vacunas que utilizan versiones 2P, aunque las comparaciones de eficacia en los ensayos clínicos se ven muy dificultadas por las distintas formas en que se expresan los resultados (Sanders y Moore 2021). Sin embargo, un estudio de la Universidad de Oxford y el Instituto Jenner ha mostrado que células epiteliales humanas transfectadas *in vitro* con ChAdOx1 nCoV-19 expresan en su superficie la proteína S mayoritariamente en la configuración de prefusión; y especulan que tras la vacunación intramuscular el vector recombinante es incorporado por células musculares, fibroblastos y células inmunitarias que (como también ocurre con las células epiteliales usadas en el estudio) no poseen cantidades significativas de ACE2 ni de las enzimas que, como TMPRSS2, procesan a S para promover la fusión de la envoltura viral y la membrana celular, por lo que la proteína S que producen debe mantenerse en la configuración de prefusión (Watanabe *et al.* 2021).

3.3.2. Jcovden (Janssen Pharmaceutical Companies)

La compañía farmacéutica Janssen, perteneciente a Johnson & Johnson, utilizó la plataforma del vector Ad26 defectivo y la tecnología AdVac para diseñar su vacuna frente a la COVID-19 (Abbink *et al.* 2007). El Ad26 es un adenovirus humano, perteneciente a la especie *Human mastadenovirus D*, y se le considera un virus de muy baja seroprevalencia en humanos. El vector es defectivo en las regiones E1 y E3, y en el lugar de E1 se insertó una *casette* viral contenido la secuencia de la proteína S con mutaciones en el sitio de escisión de furina (las argininas en posición 682 y 685 se sustituyeron por serina y glicocola, respectivamente) y las conocidas 2P (la lisina en posición 986 y la valina en posición 987 se sustituyen por prolinas): en consecuencia, se evita la escisión por furina que separa a las subunidades S1 y S2, lo que contribuye a la estabilidad, y se mantiene la configuración de prefusión (la proteína resultante no es fusogénica), resultando todo ello en una mayor inducción de inmunidad protectora que se demostró en los ensayos preclínicos (Bos *et al.* 2020; Mercado *et al.* 2020). El vector seleccionado para el desarrollo de la vacuna, denominado inicialmente Ad26.S.PP, pasó a llamarse Ad26.COV2.S; se demostró su capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes y respuesta celular sesgada a Th1 (Bos *et al.* 2020), además de conferir protección a macacos Rhesus (Mercado *et al.* 2020). Los resultados de estos estudios, más los realizados en macacos viejos, se tomaron como base para realizar ensayos clínicos de inmunización con una única dosis (Solforosi *et al.* 2021).

En ensayos clínicos de una sola dosis, se reportó una protección del 66,5 % frente a COVID-19 sintomático, independientemente de la menor o mayor gravedad; la protección frente a la enfermedad grave o crítica se elevó al 85,4 %, mientras que los efectos adversos se consideraron similares a los reportados con otras vacunas (Sadoff *et al.* 2021).

La vacuna Ad26.COV2-S de Janssen tiene el nombre común internacional de COVID-19 vaccine (Ad26.COV2-S [recombinant]) y el comercial de Jcovden™. Se autorizó su uso en Europa el 15 de marzo de 2021. Según su ficha técnica existente en CIMA, se administra por vía intramuscular como dosis única (no menos de $8{,}32 \times 10^8$ unidades infecciosas), aunque se admite una dosis de refuerzo al menos dos meses después; la vacuna se debe conservar y transportar congelada entre -15 °C y -25 °C, con un período de validez de dos años, pero se puede conservar o transportar entre 2 °C y 8 °C durante un período único de hasta 11 meses, sin superar la fecha de caducidad original (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1201525001/FT_1201525001.pdf). La ficha técnica señala una protección, frente a la enfermedad sintomática, del 66,9 % a los 14 días de la inmunización y del 66,1 % a los 28 días; y frente a la enfermedad grave, 76,7 % a los 14 días y 85,4 % a los 28.

3.3.3. Convidecia (CanSino Biologics)

La empresa CanSino Biologics (Tianjin, China), el Instituto de Biotecnología de Beijing (Beijing, China), y la Academia China de Ciencias Militares recurrieron a la plataforma del adenovirus humano del serotipo 5 (Ad5) defectivo para desarrollar una vacuna frente a la COVID-19, a la que inicialmente denominaron Ad5-nCoV. Este serotipo pertenece a la especie *Human mastadenovirus C*, y es uno de los muchos virus responsables de resfriado común. El vector es un Ad5 defectivo en las regiones génicas E1 y E3, al que se insertó el gen que codifica para la proteína S completa (Zhu *et al.* 2020b). Aunque no se ha

facilitado información concreta al respecto, todo hace suponer que se trata de la secuencia natural, que codifica para la proteína no estabilizada (Klasse *et al.* 2021; Sanders y Moore 2021).

El primer ensayo en humanos de la vacuna Ad5-nCoV examinó los efectos de varias concentraciones de partículas virales, administradas como una dosis única, encontrando respuestas tanto de anticuerpos neutralizantes como de células T específicas, si bien la dosis más alta, aunque más inmunógena que las menores, se asoció con una mayor reactogenicidad, manifestada como fiebre intensa, fatiga, disnea, mialgias y artralgias (Zhu *et al.* 2020b). Un segundo estudio estableció que concentraciones moderadas, siempre en pautas de una sola dosis, inducían respuestas significativas de anticuerpos neutralizantes y células T productoras de IFN-γ (Zhu *et al.* 2020a).

A las consideraciones que se derivan del uso como antígeno protector de una versión de la proteína S no estabilizada en prefusión (ya comentadas al tratar de Vaxzevria y Covishield) se suma el conflicto de utilizar un vector derivado de una adenovirus cuya seroprevalencia es elevada. Esta limitación ya fue manifestada cuando se ensayaron pautas de Ad5-nCoV con una segunda dosis (de refuerzo), cuyos efectos fueron menores de los esperable, lo que se atribuyó a la inmunidad preexistente frente al adenovirus vector (Zhu *et al.* 2021); en base a lo aconsejado para la vacuna Vaxzevria (Voysey *et al.* 2021), los autores de este estudio sugirieron que la prolongación del intervalo entre ambas dosis por encima de 12 semanas podría minimizar el efecto negativo de la inmunidad frente al Ad5 (Zhu *et al.* 2021). Adicionalmente, se ha señalado que si tras la primera dosis del vector Ad5-nCoV se administran dosis de refuerzo de otra vacuna que no esté vectorizada por adenovirus (lo que se conoce como régimen heterólogo, discutido en la sección 3.8), estas dosis de refuerzo no se verían afectadas por la inmunidad previa frente al Ad5, que habría resultado potenciada por la primera dosis; por ejemplo, la combinación de una primera dosis de Ad5-nCoV seguida de una o dos dosis de la vacuna subunidad ZF2001 (Zifivax), que consiste en un dímero del RBD asociado a un adyuvante, ha mostrado una inmunogenicidad satisfactoria, ya que en ZF2001 no hay nada que pueda unirse a los anticuerpos frente al Ad5 (Jin *et al.* 2022). En un ensayo clínico en fase III, una dosis única de Ad5-nCoV mostró una protección del 57,5 % frente a la COVID-19 sintomática y del 91,7 % contra la enfermedad grave (Halperin *et al.* 2022).

La vacuna Ad5-nCoV se ha registrado con el nombre comercial de Convidecia™. Hasta la fecha no ha sido autorizada por EMA. Según el documento de recomendaciones provisionales de la OMS para el uso de esta vacuna, actualizado a 19 de mayo de 2022, Convidecia se administra como una inyección intramuscular única que contiene 5×10^{10} partículas virales; debe almacenarse y transportarse entre 2 y 8 °C, con una caducidad de 12 meses; y se le atribuye una protección del 64 % frente a la enfermedad sintomática y del 92 % frente a la enfermedad grave, sin que por el momento se hayan encontrado diferencias significativas en los porcentajes de protección en el colectivo de individuos con serología previa positiva para Ad5 (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/354408/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE_recommendation-Ad5-nCoV-S-background-2022.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

3.4. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas de proteínas recombinantes

3.4.1. Nuvaxovid (Novavax)

La compañía Novavax aplicó su plataforma para elaboración de vacunas de proteínas recombinantes presentadas como nanopartículas, en combinación con su adyuvante Matrix-M™, al desarrollo de una vacuna que denominó NVX-CoV2373. Matrix-M consiste en la mezcla de nanopartículas (~40 nm de diámetro) de Matrix-A y Matrix-C, construidas respectivamente con dos fracciones purificadas de saponinas (glucósidos triterpénicos) obtenidas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*, adicionadas de colesterol y fosfolípidos para constituir las matrices; la proporción de Matrix-A y Matrix-C asegura una buena adyuvanticidad con mínima reactogenicidad (Lövgren Bengtsson *et al.* 2011). Este tipo de adyuvantes matriciales no incorporan físicamente el antígeno, sino que se administran conjuntamente (Lövgren Bengtsson *et al.* 2011), y actúan promoviendo el reclutamiento de leucocitos en los ganglios linfáticos locales, estimulando las funciones de las células dendríticas en la captación, procesamiento y presentación del antígeno, y favoreciendo la activación de los linfocitos (Reimer *et al.* 2012).

La proteína recombinante de la vacuna NVX-CoV2373 se obtuvo por clonación del gen de la proteína S, con una triple mutación en el sitio de escisión de la furina (las tres argininas en las posiciones 682, 683 y 685 fueron sustituidas por glutaminas) y la ya descrita mutación 2P (la lisina en 986 y la valina en 987 sustituídas por prolinas) para conseguir una conformación estable en prefusión; el gen se insertó en baculovirus para transfectar la línea celular Sf9 (de la polilla del maíz *Spodoptera frugiperda*) de cuyos cultivos se purificó la proteína recombinante (Tian *et al.* 2021).

Los ensayos preclínicos en ratones y monos babuinos evidenciaron una buena inmunogenicidad, con producción de anticuerpos neutralizantes, respuesta de células T

$CD4^+$ sesgada hacia Th1, células Th foliculares y células T $CD8^+$ (Tian *et al.* 2021). Los ensayos clínicos confirmaron la eficacia y seguridad de un régimen de dos dosis (cada una con 5 µg de nanopartículas de proteína S recombinante más 50 µg de adyuvante Matrix-M) administradas con 21 días de diferencia, que tuvo una eficacia global del 89,7 % frente a la enfermedad sintomática, aunque disminuyó frente a las nuevas variantes emergentes durante el desarrollo del ensayo (Heath *et al.* 2021).

La vacuna NVX-CoV2373 se ha comercializado con el nombre de Nuvaxovid™. La fecha de aprobación condicional por EMA es del 20 de diciembre de 2021. La ficha técnica existente en CIMA indica que se administra por vía intramuscular como una serie de dos dosis de 5 µg de proteína cada una, con tres semanas de intervalo; el período de validez de los viales sin abrir, conservados entre 2 °C y 8 °C y protegidos de la luz, es de nueve meses (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1211618001/FT_1211618001.pdf). Respecto de la eficacia del régimen propuesto, la ficha técnica recoge valores de protección frente a la enfermedad sintomática del 90,4 % y 89,7 % obtenidos en sendos ensayos en fase III.

3.4.2. Covovax (Serum Institute of India)

Covovax es el nombre comercial de la vacuna NVX-CoV2373 desarrollada por Novavax y fabricada por el Serum Institute of India, habiendo sido autorizada en India, Bangladesh, Indonesia, Filipinas y Tailandia.

3.4.3. SKYCovione (SK Bioscience)

SK Bioscience, de Corea del Sur, desarrolló esta vacuna, inicialmente denominada GBP510 y basada en el RBD recombinante presentado de forma multivalente en la superficie de nanopartículas proteicas. Las nanopartículas usadas constan de dos unidades, una fabricada con trímeros y la otra con pentámeros; el péptido RBD se fusionó con la unidad de trímeros (60 péptidos por unidad). En los ensayos preclínicos, administrada en dos dosis con el adyuvante de escualeno AddaVax, GBP510 indujo anticuerpos neutralizantes en ratones BALB/c, en ratones transgénicos que solo producen inmunoglobulinas humanas (es decir, que expresan un repertorio de especificidades humano) y en macacos; además, protegió a los ratones frente a la infección con la cepa SARS-CoV-2 MA adaptada al ratón (Walls *et al.* 2023). Un ensayo en macacos, en el que al adyuvante se cambió por AS03 (escualeno y tocoferol), mostró protección frente al desafío con la variante Delta de Ómicron (Jacob-Dolan *et al.* 2023). Los ensayos clínicos en fase I/II y fase III fueron favorables (https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document_files/SKYCovione_PEG-TAG_August2023.pdf), lo que condujo a una evaluación positiva (junio de 2023) para su inclusión en la lista de vacunas autorizadas por EUL. Paralelamente, SKYCovione se sometió a evaluación por la EMA, pero esta Agencia encontró que la empresa no había proporcionado datos suficientes para informar favorablemente la solicitud, con lo que la empresa retiró su solicitud con fecha 1 de septiembre de 2023, aduciendo motivos comerciales (https://www.ema.europa.eu/en/documents/medicine-qa/questions-and-answers-withdrawal-application-marketing-authorisation-skycovion-covid-19-vaccine-recombinant-adjuvanted_en.pdf).

3.5. Vacunas autorizadas por EUL: vacunas con virus completo inactivado

3.5.1. CoronaVac (Sinovac Life Sciences Co., Ltd)

Sinovac ya había producido una vacuna frente al SARS basada en el virus completo inactivado con β-propiolactona, que llegó al ensayo clínico en fase I con resultados satisfactorios en 2007, aunque no se continuó su evaluación clínica (Russell *et al.* 2021). Esta tecnología se aplicó al desarrollo de una vacuna para la COVID-19, a la que se denominó inicialmente PiCoVacc. La cepa CN2 de SARS-CoV-2 se cultivó en células Vero (una línea celular de morfología epitelial, derivada de riñón de mono, ampliamente utilizada en virología) y se inactivó usando β-propiolactona, tras lo cual se obtuvo una preparación purificada de PiCoVacc; en los ensayos preclínicos ratones y ratas PiCoVacc adsorbido en alumbre (hidróxido y sales de aluminio, utilizado como adyuvante) demostró su capacidad para inducir anticuerpos neutralizantes y para conferir protección frente a la infección experimental en en macacos Rhesus (Gao *et al.* 2020). Al tratarse de una vacuna que contiene todos los antígenos estructurales del virus, se planteó el riesgo teórico de que algunos de los muchos anticuerpos no neutralizantes inducidos pudieran actuar como facilitadores de la infección (posible efecto adverso de algunas vacunas, ya señalado en la Introducción al comentar las enseñanzas debidas a los brotes de SARS y MERS), lo que fue descartado por los resultados de estos ensayos preclínicos (Gao *et al.* 2020). Los primeros ensayos clínicos de PiCoVacc, ya bajo la nueva denominación de CoronaVac, mostraron que fue bien tolerado e indujo respuestas de anticuerpos neutralizantes contra el SARS-CoV-2 (Zhang *et al.* 2021b).

CoronaVac™ es el nombre comercial de PiCoVacc. Hasta la fecha, esta vacuna no ha sido autorizada por EMA. Según el documento de antecedentes de las recomendaciones provisionales de la OMS para el uso de la vacuna COVID-19 inactivada, CoronaVac, actualizado a 24 de mayo de 2021, cada dosis de 0,5 ml se compone de 3 µg de virus SARS-CoV-2 inactivado, incorporado en

hidróxido de aluminio; conservada entre 2 °C y 8 °C el período de validez se extiende a dos años. El documento recoge resultados de varios ensayos clínicos en fase III, con protección frente a la enfermedad sintomática de cualquier gravedad entre el 50,7 % y el 83,5 % (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/341455/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-Sinovac-CoronaVac-background-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). El documento de recomendaciones provisionales actualizado a 15 de marzo de 2022 recomienda una pauta de vacunación primaria de dos dosis (0,5 ml) administradas por vía intramuscular con un intervalo de 4 semanas, y aporta nuevos resultados de eficacia para pautas de tres dosis: 79 % frente a infección sintomática, 86 % contra la hospitalización y 92 % contra el ingreso en la UCI (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/354226/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-Sinovac-CoronaVac-2022.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

3.5.2. *Sinopharm COVID-19 vaccine o BBIBP-CorV (Sinopharm CNBG y Beijing Institute of Biological Products)*

El Beijing Institute of Biological Products Co., Ltd. (BIBP) y el China National Biotec Group (CNBG), empresa subsidiaria de China National Pharmaceutical Group Corporation (Sinopharm) han desarrollado una vacuna de virus incativado, mediante una tecnología similar a la descrita para CoronaVac. En este caso, se eligió la cepa HB02, cuya secuencia genómica se examinó para asegurar su idoneidad como cepa vacunal; el virus cultivado en células Vero e inactivado con β-propiolactona (en cada lote se valida la eficacia de la inactivación) constituye la vacuna BBIBP-CorV, que se administra adsorbida en adyuvante de hidróxido de aluminio (Wang *et al.* 2020).

La inmunogenicidad de BBIBP-CorV se comprobó en ratas, ratones, cobayos, conejos y monos, en todos los cuales indujo anticuerpos neutralizantes; también exhibió capacidad para proteger a macacos Rhesus frente a la infección con SARS-CoV-2, sin evidencias de efecto de facilitación de la infección dependiente de anticuerpos ni complicaciones inmunopatológicas (Wang *et al.* 2020). Los primeros ensayos clínicos mostraron que BBIBP-CorV era bien tolerada en humanos y que una pauta de dos dosis inducía títulos altos de anticuerpos neutralizantes (Xia *et al.* 2021).

Esta vacuna no figura entre las autorizadas por la EMA. Según el documento de recomendaciones provisionales de la OMS, actualizado a 15 de mayo de 2022, la pauta recomendada de administración es de dos dosis por vía intramuscular, con un intervalo de tres a cuatro semanas (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/353803/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-BIBP-2022.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y). El documento de antecedentes de la OMS, de 7 de mayo de 2021, dice que cada dosis contiene 4 µg de virus inactivado, adsorbido en hidróxido de aluminio; la vacuna debe almacenarse y transportarse en refrigeración (de 2 °C a 8 °C), protegida de la luz, y su período de caducidad se ha estimado en 24 meses (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/341252/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-BIBP-background-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). En cuanto a su eficacia, el documento de recomendaciones provisionales recogió inicialmente los resultados de un ensayo clínico en fase III con un 79 % de protección frente a la enfermedad sintomática; posteriormente, se han introducido nuevos resultados que oscilan entre el 50 % y el 69 % en la protección frente a la enfermedad sintomática y entre el 94 % y el 88 % en la protección frente a la mortalidad.

3.5.3. *Covaxin (Bharat Biotech)*

La empresa Bharat Biotech International Limited, ubicada en la India, desarrolló esta vacuna de virus inactivado en colaboración con el National Institute of Virology (NIV), perteneciente al el Indian Council of Medical Research (ICMR). Se utilizó la cepa NIV-2020-770, aislada en la India y cuyo genoma tiene una identidad del 99,97 % con el de la cepa Wuhan Hu-1 (Yadav *et al.* 2021). El virus se sometió a tres procesos consecutivos de inactivación con β-propiolactona, y tras su purificación se comprobó que retenía los antígenos S y N; con la vacuna resultante, denominada BBV152, se prepararon varias formulaciones, que se pasaron a ensayos preclínicos (Ganneru *et al.* 2021). Es relevante la combinación de adyuvantes utilizados: el virus se adsorbió en gel de hidróxido de aluminio (Algel), como en los casos de las vacunas inactivadas de Sinovac y de Sinopharm, pero se añadió una molécula de imidazoquinolina, designada como IMDG, que es agonista de los PRRs endosomiales TLR7 y TLR8, cuyos ligandos naturales son RNAs virales; TLR7 y TLR8 se expresan en subpoblaciones de células dendríticas, monocitos, macrófagos, neutrófilos, mastocitos y eosinófilos, y su activación conduce a la liberación de citocinas proinflamatorias y de interferones de tipo I (IFN-α e IFN-β); y se ha demostrado que estos interferones promueven la presentación cruzada de antígenos, que como se explicó en la sección 1.3.2, permite presentar antígenos exógenos, asociados a moléculas de MHC-I, a las células T $CD8^+$ para generar respuestas de inmunidad celular (Bhagchandani *et al.* 2021). Dado que los antígenos de las vacunas inactivadas son exógenos (no hay posibilidad de que se sinteticen *de novo* dentro de células del sujeto

vacunado), la presentación cruzada es la única manera de que estas vacunas induzcan una inmunidad celular efectiva. Además, la acción adyuvante del alumbre tiende a desviar la respuesta de células T $CD4^+$ hacia la subpoblación Th2, lo cual es indeseable en el caso de las vacunas frente al SARS-CoV-2; la presencia del agonista de TLR7/8 invierte la situación sesgando la respuesta hacia las células Th1, lo que confiere a BBV152 una ventaja significativa frente a otras vacunas de virus inactivado (Li y Zhu 2021). De hecho, los ensayos realizados con BBV152 administrada con Algel-IMDG en ratones, ratas y conejos mostraron este sesgo hacia Th1, que no ha podido ser demostrado con otras vacunas como CoronaVac (Ganneru *et al.* 2021). Otros ensayos preclínicos evidenciaron que la vacuna BBV152 fue inmunógena y protegió frente a la infección experimental con SARS-CoV-2 a hámsteres sirios (Mohandas *et al.* 2021) y macacos Rhesus (Yadav *et al.* 2021).

La vacuna BBV152 ha adoptado como nombre comercial Covaxin™. A la fecha de redacción de este capítulo, no has sido autorizada por la EMA. Según el documento de antecedentes de la OMS, de 3 de noviembre de 2021, se administra como inyección intramuscular en dos dosis (6 µg de antígeno, 15 µg de IMDG y 250 µg de hidróxido de aluminio en 0,5 ml) con 4 semanas de intervalo; se conserva en refrigeración (de 2 °C a 8 °C) y el período de validez es de nueve meses (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/347044/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-BBV152-background-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Según este documento, la protección global (en el curso de los ensayos en fase III ya había variantes emergentes del virus) frente a la enfermedad sintomática (de cualquier gravedad) fue del 70,8 %. El documento de recomendaciones provisionales, actualizado a 15 de marzo de 2022, recoge una eficacia del 78 % para la enfermedad sintomática y del 93 % para la enfermedad grave (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/352468/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-BBV152-2022.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

3.6. Vacunas autorizadas por la Comisión Europea

De acuerdo con la legislación farmacéutica de la UE, la aprobación de una nueva vacuna requiere una evaluación científica que demuestre que los beneficios superan con mucho a los efectos secundarios y riesgos potenciales. Es un proceso que se inicia con la solicitud de la autorización, acompañada de los resultados de todas las investigaciones y ensayos preclínicos y clínicos realizados; los expertos de la EMA realizan su evaluación y emiten una opinión científica; la Comisión Europea revisa esta opinión y, en su caso, concede la autorización para la comercialización; finalmente, las autoridades nacionales de los países de la UE deciden la incorporación de la vacuna en sus sistemas de salud (https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-public-health-emergency-international-concern-2020-23/covid-19-vaccines-development-evaluation-approval-and-monitoring#ema-inpage-item-13443).

En diciembre de 2023, en la cartera de vacunas frente a la COVID-19 autorizadas por la Comisión Europea hay ocho, fabricadas por BioNTech/Pfizer (Comirnaty), Moderna (Spikevax), AstraZeneca (Vaxzebria), Janssen Pharmaceutica NV (Jcovden), Novavax (Nuvaxovid), Valneva (VLA2001), Sanofi/GSK (VidPrevtyn Beta) e HIPRA (BIMERVAX). En https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans_en#eus-vaccine-portfolio (*European Commission*, *Safe COVID-19 vaccines for Europeans*) se indica el tipo de vacunas y las pautas de dosis para la inmunización; mientras que en https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/coronavirus-response/public-health/eu-vaccines-strategy_en (*European Commission*, *EU Vaccines Strategy*) pueden consultarse las fechas de aprobación y las dosis distribuídas a 7 de septiembre de 2023.

De las ocho vacunas aprobadas, cinco (Comirnaty, Spikevax, Vaxzebria, Jcovden y Nuvaxovid) figuran entre las 12 aprobadas por la OMS a través del procedimiento EUL, y se han descrito en las secciones 3.2 a 3.5. En los meses de septiembre y octubre de 2022 se autorizaron versiones adaptadas de Comirnaty, Spikevax y Nuvaxovid, que incluyen antígenos de la variante Ómicron. Se describen a continuación las tres vacunas que no han sido aprobadas aún por EUL.

3.6.1. VLA2001

La empresa Valneva Austria GmbH obtuvo en junio de 2022 la autorización de la Comisión Europea para comercializar su vacuna VLA2001, consistente en el virus entero, inactivado con β-propiolactona, de la cepa Wuhan hCoV-9/Italia/INMI1-isl/2020 del SARS-CoV-2, incorporado a los adyuvantes alúmina y CpG1080. Sin embargo, por motivos comerciales, la empresa solicitó la retirada de esta autorización, lo que se llevó a efecto el 12 de octubre de 2023 (https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-covid-19-vaccine-inactivated-adjuvanted-valneva_en.pdf). Por este motivo, VLA2001 no figura en el listado de vacunas autorizadas de EMA (https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/

covid-19-medicines#authorised-covid-19-vaccines-section), aunque no ha sido todavía excluida de la cartera de la Comisión Europea (https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans_en#eus-vaccine-portfolio).

3.6.2. *VidPrevtyn Beta*

La empresa francesa Sanofi ha desarrollado varias candidatas a vacunas bajo la denominación global CoV2 preS dTM-AS03, basadas en la proteína S producida en un sistema de expresión de baculovirus y células de insecto; la proteína recombinante trimérica está estabilizada por mutaciones S-2P (sustituyendo los aminoácidos 986 y 987 por prolinas) en la configuración de prefusión y carece del dominio transmembrana (TM) que ha sido sustituido por un dominio plegable T4, para favorecer la trimerización; se ha designado como preS dTM y en las formulaciones se incorpora al adyuvante AS03 (escualeno y tocoferol) elaborado por GSK (Francica *et al.* 2021). De estas candidatas, la construida con la proteína S de la cepa B.1.351 (variante Beta de SARS-CV-2) ha mostrado excelentes resultados aplicada como dosis de refuerzo en individuos previamente inmunizados con vacunas de mRNA o vectorizadas en adenovirus (deBruyn *et al.* 2023) y como tal se recomienda su uso por la EMA (https://www.ema.europa.eu/es/documents/overview/vidprevtyn-beta-epar-medicine-overview_es.pdf). La vacuna fue autorizada el 10 de noviembre de 2022 con el nombre comercial de VidPrevtyn Beta (https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines#authorised-covid-19-vaccines-section).

3.6.3. *BIMERVAX*

Laboratorios Hipra, S.A. es el nombre de una multinacional farmacéutica española, fundada en 1954; dedicada en principio a productos de sanidad animal, creó en 2021 una División de Salud Humana que ha aplicado su experiencia en inmunoprevención de enfermedades infecciosas al desarrollo de una vacuna subunidad frente a la COVID-19. La vacuna, cuyo nombre comercial es BIMERVAX, se denominó inicialmente PHH-1V y consiste en un heterodímero formado por los RBDs recombinantes de las variantes B.1.1.7 (Alfa) y B.1.351 (Beta) del SARS-CoV-2, expresados en células CHO (una línea celular de hámster chino); este antígeno, debidamente purificado, se incorpora al adyuvante SQBA que contiene escualeno, polisorbato 80 y trioleato de sorbitán (Barreiro *et al.* 2023; Moros *et al.* 2023).

Los estudios preclínicos realizados en cerdos mostraron un buen perfil de seguridad; el régimen de dos dosis produjo una buena respuesta de anticuerpos capaces de neutralizar distintas variantes del virus y una respuesta de células T productoras de interferón gamma y, por tanto, presumiblemente de la subpoblación Th1 (Moros *et al.* 2023). El régimen de dos dosis protegió de la infección a ratones transgénicos K18-hACE2 (Barreiro *et al.* 2023). Un ensayo clínico en fase I/II evidenció que el régimen de dos dosis es bien tolerado, sin que se comunicaran efectos adversos de interés; hubo buenas respuestas de anticuerpos neutralizantes, aunque la respuesta de células T específicas fue moderada (Leal *et al.* 2023). Otro ensayo clínico, en fase II, puso de manifiesto que PHH-1V es una buena vacuna de refuerzo heterólogo; en personas vacunadas previamente con Comirnaty produjo una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra las variantes Beta circulantes anteriores y Omicron BA.1, superior a la conseguida con el refuerzo homólogo de Comirnaty (Corominas *et al.* 2023). Por ello, teniendo además presente los análisis de otros ensayos clínicos (incluyendo ensayos multicéntricos en fase III) y dada la amplia cobertura de las vacunas de primera generación en Europa, la EMA autorizo su comercialización en marzo de 2023, como vacuna de refuerzo en personas que han recibido la última dosis de una vacuna de mRNA al menos seis meses antes (https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-bimervax_en.pdf), lo que ha sido recogido en la ficha técnica (https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1221709001/FT_1221709001.pdf). Según esta, se administra en una única dosis intramuscular conteniendo 40 µg de herodímero no siendo necesario ajustar esta dosis en personas mayores; se conserva en frigorífico, con una caducidad de 15 meses.

3.7. Otras vacunas

3.7.1. *Diversidad de vacunas candidatas frente a la COVID-19*

En respuesta a la amenaza de la pandemia y aprovechando los avances tecnológicos que proporcionan una variedad de plataformas para la elaboración de vacunas se ha disparado en todo el mundo el desarrollo de formulaciones candidatas para la inmunoprevención de la COVID-19 o, al menos, de sus manifestaciones más graves. El *VIPER Group COVID19 Vaccine Tracker Team*, sufragado por la *McGill University Interdisciplinary Initiative in Infection and Immunity*, ha realizado un seguimiento de los candidatos a vacunas frente a la COVID-19 hasta el 2 de diciembre de 2022 y, aunque desde esa fecha no se ha actualizado, la información que ofrece en https://covid19.trackvaccines.org/ es rigurosa y útil: se recoge un total de 292 vacunas, agrupadas en

«vacunas aprobadas» en distintos países (50, incluyendo las 12 autorizadas por la OMS a través de EUL), «vacunas en ensayos clínicos en fase III» (92), «vacunas en ensayos clínicos en fase II» (72), «vacunas en ensayos clínicos en fase I» (66) y «vacunas que no progresan» (12). Para ilustrar la dinámica del área, baste señalar que en una consulta realizada en el mismo sitio cuatro meses antes, se registraban 220 vacunas, de las que 40 habían recibido aprobación.

El ya citado *COVID-19 vaccine tracker and landscape* elaborado por la OMS, consultado en agosto de 2022, recogía un total de 169 vacunas candidatas en desarrollo clínico (incluyendo 11 autorizadas por EUL y otras 22 en proceso de autorización) y 198 en desarrollo preclínico. En su actualización más reciente (30 de marzo de 2023), hay un total de 382 vacunas, de ellas 183 en desarrollo clínico y 199 en desarrollo preclínico (https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines). Las vacunas en desarrollo clínico se agrupan, según las plataformas de diseño y fabricación, en 11 grupos: virus inactivado (22 vacunas), virus atenuado (2), vacunas subunidad de proteína recombinante (59), vector viral no replicante (25), vector viral replicante (4), partículas semejantes a virus (7), vacunas de DNA (17), vacunas de mRNA (43), vector viral no replicante incorporado a células presentadoras de antígeno (1), vector viral replicante incorporado a células presentadoras de antígeno (2) y vector bacteriano de expresión en esporas (1); se observa que el mayor porcentaje corresponde a las vacunas subunidad (32,2 %), seguidas de las de mRNA (23,5 %), vector viral no replicante (13,7 %), virus inactivado (12 %) y DNA (9,3 %).

3.7.2. *Vacunas en estado de evaluación para su autorización por EUL*

El documento de guía de la OMS sobre el estado del proceso de evaluación de las vacunas frente a la COVID-19, actualizado a 8 de agosto de 2023, incluye 28 vacunas que iniciaron pero que, por diversas causas, aún no han completado el proceso (https://extranet.who.int/prequal/sites/default/files/document_files/Status_COVID_VAX_08AUgust2023.pdf). A continuación se presentan agrupadas por sus plataformas tecnológicas.

Vacunas de mRNA:

— ARCT-154: Vacuna de mRNA autorreplicante de la proteína S. La han desarrollado Arcturus Therapeutics (USA) y CSL Seqirus. Recientemente (septiembre de 2023) se ha comunicado la aceptación por la EMA de la solicitud de comercialización, dados los resultados favorables del ensayo clínico en fase III; se espera su autorización por la Comisión Europea en 2024. Esta empresa tiene otras vacunas de mRNA en desarrollo (LUNAR-COV19/ARCT-021, ARCT-165).

— Zorecimeran, nombre genérico de la vacuna CVnCoV: Vacuna de mRNA no modificado, que codifica para la proteína S estabilizada en prefusión y formulada en LNPs. Esta vacuna, desarrollada por CureVac (Alemania), fue retirada de los ensayos clínicos en octubre de 2021 por el fabricante, porque su nivel de protección fue considerado insuficiente (CureVac, en colaboración con GlaxoSmithKline, ha desarrollado una nueva vacuna de mRNA, denominada CV2CoV, que ya ha iniciado sus ensayos clínicos).

Vacunas de vector viral no replicante:

— Sputnik V: Vacuna basada en un doble vector de adenovirus humanos (Ad26 y Ad5) portadores de la secuencia génica de la proteína S (no hay ninguna indicación de que no sea la secuencia natural, que codifica para la forma metaestable); el uso de dos adenovirus humanos distintos como vectores para cada una de las dos dosis evita que la memoria inmunológica de desvíe hacia el vector. Es un producto del Russian Direct Investment Fund (Rusia).

— Vaccine R-COVID: Consiste en el vector adenoviral ChAdOx1 con la *casette* que contiene la secuencia génica de la proteína S no estabilizada, comercializado por AstraZeneca con la denominación de Vaxzevria. La fabrica R-Pharm (Rusia) con licencia de AstraZeneca.

— AZD1222, otra versión de la vacuna Vaxzevria, con el vector adenoviral ChAdOx1 portador de la *casette* con la secuencia génica de la proteína S no estabilizada en prefusión. La fabrica el Instituto de Tecnologia e Imunobiológicos Bio-Manguinhos/Fiocruz (Brasil), con licencia de AstraZeneca.

— Convidecia Air ™: Es la misma vacuna que se ha descrito en la sección 3.3.3, elaborada por CanSino Biologics, en la que el gen que codifica para la proteína S completa se administra vectorizado por Ad5-nCoV; la diferencia es la formulación farmacéutica, ya que Convidecia Air se administra en forma de aerosol para inhalar, con el objetivo de inducir inmunidad mucosal. Se han publicado los resultados de un ensayo clínico en fase I, con buena tolerancia e inmunogenicidad; puede usarse como refuerzo de una dosis previa de la vacuna intramuscular (Wu *et al.* 2021).

Vacunas subunidad (proteína recombinante):

— CoV2 preS dTM-AS03: Esta denominación incluye varias vacunas que contienen antígeno S recombinante formulado en emulsión con el adyuvante AS03 (de-Bruyn *et al.* 2023). La formulación Sanofi-GSK, elaborada con la proteína S de la cepa B.1.351 (variante

Beta del SARS-CoV-2) se ha comercializado con el nombre de VidPrevtyn Beta y ha sido autorizada por la EMA (ver sección 3.6.2).

— SCB-2019: Un trímero de proteína S recombinante, estabilizada en prefusión e incorporada al adyuvante de alumbre más un agonista del TLR9, denominado CpG1018. La produce Clover Biopharmaceuticals (China). A finales de 2022 fue autorizado su uso de emergencia en China y recientemente se han publicado los resultados de ensayos clínicos II/III, mostrando buena inmunogenicidad en pauta de dos dosis y protección cruzada frente a las variantes Gamma, Delta (Buntinx *et al.* 2023) e incluso Omicron, sobre todo en individuos con exposición previa al SARS-CoV-2 evidenciada serológicamente (Lopez *et al.* 2023).
— Recombinant Novel Coronavirus Vaccine, también denominada Zifivax o ZF2001: Es un dímero del RBD, obtenido en células CHO, que se administra incorporado en alumbre como adyuvante. Está elaborada por Anhui Zhifei Longcom Biologic Pharmacy y el Institute of Microbiology perteneciente a la Chinese Academy of Sciences (China). Se han publicado resultados satisfactorios de ensayos clínicos en fase I y II (Yang *et al.* 2021; Gao *et al.* 2023). Está en desarrollo una versión en la que el antígeno es un dímero quimérico de los RBDs de las variantes Delta y Ómicron BA.1 (Duan *et al.* 2023).
— Abdala o CIGB-66. Consiste en un RBD recombinante, expresado en la levadura *Pichia pastoris*, purificado e incorporado al adyuvante de alumbre. Ha sido desarrollada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, Cuba). Los resultados de los ensayos clínicos en fase III han sido publicados por Hernández-Bernal *et al.* (2023).
— Nuvaxovid prefilled siringe. Es una versión de Nuvaxovid: la proteína S recombinante, estabilizada en prefusión, se incorpora al adyuvante Matrix-M. La prepara SK Bioscience (Corea del Sur) en virtud de una licencia de Novavax.
— Corbevax: Es también un RBD recombinante, que se ha expresado en la levadura *Pichia pastoris*, y una vez purificado se incorpora al adyuvante de alumbre más un agonista de TLR9, CpG1018. Ha sido desarrollada por el Texas Children's Hospital Center for Vaccine Development, el Baylor College of Medicine (Houston, Texas) y Dynavax technologies (Emeryville, California); la fabrica Biological E (Bio E, India) en colaboración con la Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI, India). El agonista CpG1018 potencia la respuesta de células B y ya ha sido utilizado en vacunas humanas. Se ha comunicado que Corbevax indujo mayores respuestas de anticuerpos neutralizantes en ensayos de fase III que Covishield (vacuna vectorizada por adenovirus y autorizada por EUL, sección 3.3.1) (Thuluva *et al.* 2023). Se está desarrollando una vacuna similar adaptada a los nuevos sub-linajes de la variante Ómicron (Thimmiraju *et al.* 2023).
— Recombinant COVID-19 Vaccine. Constituída por un RBD recombinante, expresado en células de insecto Sf9 mediante transfección con baculovirus; se formula incorporada en adyuvante de alumbre. Fabricada por WestVac Biopharma (China).
— Nanocovax: Vacuna de proteína S recombinante, estabilizada en prefusión e incorporada en alumbre. La produce Nanogen Pharmaceutical Biotechnology (Vietnam). Se han publicado los resultados de ensayos clínicos en fase I y II (Nguyen *et al.* 2022).
— SpikoGen: Proteína S recombinante, expresada en el sistema de baculovirus y células Sf9 de insecto, purificada y mezclada con el adyuvante en nanopartículas Advax-CpG55.2 (constituído por inulina y un oligonucleótido agonista de TLR9). El fabricante es Cinnagen (Irán). Pueden verse los resultados del ensayo clínico en fase 3 en la publicación de Tabarsi *et al.* (2023).
— UB-612: Esta vacuna consta del péptido RBD recombinante, producido en células CHO y fusionado a un dominio Fc de la IgG1, que forma complejo con cinco epítopos sintéticos de las proteínas S2, M y N, seleccionados por estar presentes en todas las variantes de SRAS-CoV-2 y por su capacidad para activar células T $CD4^+$ y T $CD8^+$, y con un sexto péptido diseñado para estimular la activación de las células Th; se administra con CpG1 (solución de desoxinucleótidos, agonista de TLR9) y fosfato de aluminio como adyuvante (Wang *et al.* 2023). Ha sido desarrollada por Vaxxinity (Estados Unidos), anteriormente conocida como Covaxx. Por su composición, esta vacuna se ha propuesto como vacuna universal frente a SARS-CoV-2, habiéndose comprobado que una tercera dosis de refuerzo, administrada después de la pauta clásica de dos dosis, induce anticuerpos neutralizantes frente al virus original y las variantes Delta y Ómicron (Wang *et al.* 2023a).
— SCTV01C: Fabricada por la empresa biotecnológica china Sinocelltech Ltd., esta vacuna bivalente está compuesta por los ectodominios de la proteína S de las variantes Alfa y Beta del SARS-CoV-2 emulsionados en el adyuvante de escualeno SCT-VA02B. En sujetos no inmunizados, un régimen de dos dosis fue bien tolerado e indujo anticuerpos neutralizantes, incluso frente a Delta y Ómicron (Wang *et al.* 2023b). Como refuerzo heterólogo en sujetos previamente vacunados con dos dosis de vacunas

inactivadas (Hannawi *et al.* 2023b) y mRNA (Hannawi *et al.* 2023c) fue igualmente seguro y produjo respuestas cruzadas neutralizantes frente a estas variantes. Está en evaluación SCTV01E, vacuna tetravalente con ectodominios S de las variantes Alfa, Beta, Delta y Omicron BA.1 (Hannawi *et al.* 2023a).

— Razi Cov Pars Vaccine: Esta vacuna, fabricada por Razi Vaccine & Serum Research Institute (Irán), contiene las proteínas S1 y S2 y el trímero S en estado abierto, producidas en líneas celulares humanas e incorporadas en el adyuvante RAS-01 (emulsión de aceites de sésamo, oliva y soja en agua con el tensioactivo Tween 80). En los estudios preclínicos en roedores se siguió un régimen de dos dosis por vía intramuscular y una dosis intranasal de refuerzo, obteniéndose buenas respuestas de anticuerpos neutralizantes y de protección en hámsters (Banihashemi *et al.* 2022). En un ensayo clínico de fase II, siguiendo el mismo régimen, solo se detectaron efectos adversos moderados, mientras que se registró una buena respuesta de anticuerpos y, predominantemente, de células Th1 y CTL (Mohazzab *et al.* 2023).
— MVC-COV1901: Se trata de una vacuna de subunidad basada en la proteína S estabilizada en prefusión (S-2P), producida en células humanas para conservar el patrón de glicosilación, e incorporada a los adyuvantes CpG1018 e hidróxido de aluminio (Kuo *et al.* 2020). Un análisis intermedio de resultados de un ensayo en fase III sugiere una buena inmunogenicidad, con respuesta favorablemente sesgada hacia las células Th1 (Torales *et al.* 2023).
— BIMERVAX: La vacuna recombinante fabricada por HIPRA ha sido aprobada por la EMA y autorizada por la Comisión Europea; se describe en la sección 3.6.3.
— AKS-452 Vaccine (AmbiVax-CTM): El antígeno de esta vacuna es una proteína de fusión entre el RBD y la porción Fc de la IgG1 humana; la porción Fc se añade para mejorar la inmunogenicidad, al mediar la incorporación del antígeno por las células presentadoras (APC), que poseen en su superficie receptores para ella (FcγR), además de conferir termoestabilidad y facilitar un correcto plegamiento de la proteína; el antígeno va emulsificado en el adyuvante emulsificación en Montanide™ ISA 720 (Alleva *et al.* 2021). Los resultados de los ensayos clínicos I/II son favorables (Feitsma *et al.* 2023). La vacuna es elaborada por Stelis Biopharma Limited (India).
— SARS CoV-2 RBD: Desarrollada por varios Departamentos del Baylor College of Medicine (Texas) y el Texas Children's Hospital, esta vacuna es muy parecida a la anteriormente descrita Corbevax y, como en aquella, el RBD recombinante se produce en la levadura *P. pastoris*; la tecnología de elaboración se ha transferido a PT Biofarma (Indonesia), que la fabrica con la denominación de Indovac (Hotez *et al.* 2023).
— S-268019: Con la denominación S-268019-b se ha designado una vacuna que consta de una proteína S recombinante completa modificada, obtenida en células de insecto transfectadas por baculovirus, incorporada al adyuvante de escualeno A-910823. Los ensayos en fase I/II mostraron que regímenes de dos dosis por vía intramuscular fueron bien tolerados e indujeron anticuerpos neutralizantes y respuestas sesgadas a Th1 (Iwata *et al.* 2022). En un ensayo en fase III esta vacuna ha mostrado su utilidad como dosis de refuerzo en personas que habían completado un régimen previo de dos dosis de vacunas de mRNA (Sonoyama *et al.* 2023). S-268019-b es producida por Shionogi & Co. Ltd (Japón).
— PIKA recombinant protein: La empresa Liaoning Yisheng Biopharma Co. () ha desarrollado esta vacuna, consistente en una proteína S trimérica recombinante administrada con el adyuvante PIKA (polyI:C), agonista del TLR3; en ensayos preclínicos con monos *Cynomolgus* se han observado potentes respuestas de IgG1, lo que sugiere la colaboración de células Th1 (Wang *et al.* 2023c).
— Covifenz: Esta candidata a vacuna estaba constituida por una Proteína S recombinante, estabilizada en prefusión, expresada en la planta *Nicotiana benthamiana* usando como vector transfectante la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; en la vacuna, el antígeno se disponía en VLPs mezclado con el adyuvante AS03 de GSK. Fue desarrollada por Medicago (Canadá), pero finalmente se retiró la solicitud de aprobación por EUL.

Vacunas de virus inactivado:

— Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine o WIBP-CorV: Es una vacuna de virus entero, producido en células Vero, inactivado con β-propiolactona e incorporado en adyuvante de alumbre. La fabrican Sinopharm y el Wuhan Institute of Biological Products (WIBP) (China). Los ensayos en fase I (pautas de tres inyecciones) y II (pautas de dos inyecciones) no mostraron reacciones adversas graves e indujeron anticuerpos neutralizantes en adultos (Xia *et al.* 2020) y en niños (Xia *et al.* 2022).
— CovIran Barakat o BIV1-CovIran. Diseño similar al anterior: el virus producido en células Vero es inactivado con β-propiolactona y se incorpora al adyuvante de alumbre. La elabora Shifa Pharmed, perteneciente al Barakat Pharmaceutical Group (Iran). Un ensayo clínico en fase III mostró que un régimen de dos dosis de la vacuna tuvo una eficacia del 50,2 % contra el COVID-19 sintomático, del 70,5 % contra la

enfermedad grave y del 83,1 % contra la enfermedad crítica; la vacunación fue bien tolerada y no se registraron problemas graves de seguridad (Mohraz *et al.* 2023).

— VLA2001, la vacuna de virus entero inactivado fabricada por Valneva, fue autorizada por la Comisión Europea el 24 de junio de 2022 y continúa presente en su cartera de vacunas consultada el 12 de diciembre de 2023 (https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/coronavirus-response/safe-covid-19-vaccines-europeans_en#eus-vaccine-portfolio); asimismo figura entre las vacunas en proceso de evaluación por EUL. Sin embargo, con fecha 12 de octubre de 2023 la Comisión Europea retiró la autorización de comercialización, a petición del titular, Valneva Austria GmbH, por motivos comerciales (ver sección 3.6.1).

3.7.3. Vacunas de administración intranasal

Como se ha comentado en la sección 1.3.3, un planteamiento de actualidad en el diseño de vacunas es la consideración de las ventajas que puede aportar la inmunización a través de mucosas (Lawson *et al.* 2011; Wang *et al.* 2015). Es un hecho que la mayoría de los patógenos acceden al medio interno a partir de la colonización de una mucosa y, en su caso, la translocación que les permite extenderse a tejidos profundos y diseminarse por el drenaje linfático o por la circulación sanguínea. Por ello, este patrón infeccioso induce dos tipos de respuestas específicas: la inmunidad mucosal y la sistémica. La inmunidad sistémica se establece a partir de respuestas de linfocitos B y T en ganglios linfáticos y bazo, con producción de anticuerpos e inmunidad celular que abarca todo el medio interno; las respuestas de inmunidad mucosal se inician en los llamados «sitios inductores», organizaciones de tejido linfoide bien estructurado pero carente de vasos linfáticos aferentes, que se designan con el acrónimo «MALT» (de «*mucosa-associated lymphoid tissue*») y que contienen células auxiliares presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos) y linfocitos T y B (Brandtzaeg *et al.* 2008; Wang *et al.* 2015). El MALT recibe denominaciones más concretas según las zonas anatómicas: NALT («*nasopharynx-associated lymphoid tissue*»), tejido linfoide asociado a la nasofaringe; BALT («*bronchus-associated lymphoid tissue*»), tejido linfoide asociado a los bronquios; GALT («*gut-associated lymphoid tissue*»), tejido linfoide asociado al intestino (Brandtzaeg *et al.* 2008). No hay desarrollo de BALT en humanos sanos, pero el NALT está presente, constituido por adenoides y amígdalas (el llamado «anillo de Waldeyer»), cuya superficie presenta invaginaciones (criptas) que aumentan el área de interacción con los antígenos, que penetran (antígenos solubles) o son transportados (antígenos particulados) para su interacción con células presentadoras y linfocitos (Tiboni *et al.* 2021). Como resultado, se activan las células B y T de los clones específicos correspondientes, que pasan a través de los vasos linfáticos eferentes para llegar a los ganglios locales y regionales y, finalmente, a la circulación sanguínea; hay, por tanto, una respuesta sistémica, con producción de anticuerpos plasmáticos (IgM, IgG), pero muchas células efectoras regresan a la mucosa, donde los plasmocitos producirán dímeros de IgA que son secretados, formando una barrera protectora frente a los patógenos en cuestión (Tiboni *et al.* 2021). En cambio, la administración de antígenos por vía parenteral (utilizada en la gran mayoría de las vacunas) induce respuestas sistémicas pero no inmunidad mucosal (Wang *et al.* 2015).

El SARS-CoV-2 es esencialmente un patógeno respiratorio (aunque en los casos de enfermedad grave manifieste su tropismo por diferentes órganos). El virus se adquiere por aspiración de gotitas o secreciones respiratorias de individuos infectados; la infección se inicia en la nasofaringe, donde abundan las células que expresan el receptor ACE2; los títulos altos de viriones infectivos en la nasofaringe conducen posteriormente a la progresión de la infección a lo largo del tracto respiratorio hasta los pulmones (Lin *et al.* 2022). Sin embargo, las vacunas actualmente aprobadas y disponibles frente a la COVID-19 se administran por vía parenteral (intramuscular) y producen inmunidad sistémica y confieren cierto grado de protección frente a las manifestaciones sintomáticas y una protección eficaz frente a la enfermedad grave; pero no impiden la infección en la mucosa del tracto respiratorio superior (Alu *et al.* 2022), lo que se ha demostrado por la persistencia de virus infectantes en muestras nasales de animales vacunados (Bleier *et al.* 2021). Hay que tener presente que los enfermes asintomáticos son fuente de contagio, ya que sus secreciones respiratorias contienen virus (Lin *et al.* 2022). De la misma manera, los sujetos vacunados por vía intramuscular pueden infectarse y transmitir el virus desde sus vías respiratorias superiores, aunque ellos mismos sean asintomáticos (Bleier *et al.* 2021; Tiboni *et al.* 2021). Estas limitaciones podrían evitarse mediante la vacunación por vía intranasal, que no solamente protegería al individuo vacunado sino que al impedir la replicación del virus en la mucosa respiratoria (consiguiendo lo que se conoce como «inmunidad esterilizante») serían capaces de bloquear la transmisión de persona a persona (Alu *et al.* 2022; Lin *et al.* 2022). La presencia de anticuerpos de la clase IgA en las secreciones que bañan a la mucosa respiratoria y la inducción de células T de memoria residentes en las vías respiratorias se consideran factores claves en esta inmunidad esterilizante (Tiboni *et al.* 2021; Alu *et al.* 2022).

En un estudio preclínico con la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 de Oxford/AstraZeneca, se comparó la vía de administración intramuscular con la intranasal en hámsteres: la inmunización por ambas vías protegió frente a la posterior infección experimental, pero solo la vía intranasal redujo los niveles de virus infecciosos en muestras de la orofaringe; asimismo, la inmunización intranasal en macacos Rhesus redujo las concentraciones de virus en las muestras nasales y las cargas virales en el lavado broncoalveolar y en el tejido del tracto respiratorio inferior (van Doremalen *et al.* 2021). Actualmente, hay varias vacunas intranasales para la COVID-19 en ensayos clínicos (Krammer 2023), algunas de las cuales son versiones de vacunas ya autorizadas por EUL, como es el caso de la citada ChAdOx1 nCoV-19 de Oxford/AstraZeneca o de Ad5-nCov de CanSino Biologics (Alu *et al.* 2022). Algunos estudios han combinado la inmunización parenteral con la intranasal. Utilizando una vacuna subunidad de proteína S estabilizada en prefusión, se ha demostrado que un régimen de dos dosis de la vacuna con adyuvante de hidróxido de aluminio y CpG1018 (agonista de TLR9), ambas por vía intramuscular, seguidas de una vacunación de refuerzo con el mismo antígeno combinado con el adyuvante NE01 (emulsión oleosa en agua, O/A, con etanol, cloruro de cetilpiridinio, tensioactivos no iónicos y aceite de soja), protegió eficazmente a los hámsteres de las manifestaciones patológicas de la infección experimental y además eliminó la presencia de virus en lavados nasales (Lin *et al.* 2022). Es interesante resaltar en este trabajo el uso de diferentes adyuvantes para las vías intramuscular e intranasal. En efecto, un aspecto crucial de las vacunas intranasales consiste en asegurar la llegada eficiente del antígeno a las células auxiliares que han de procesarlos y presentarlos a los linfocitos T; el antígeno debe permanecer estable en el tracto respiratorio durante un tiempo adecuado para permitir su absorción, lo que requiere el uso de formulaciones adecuadas que incluyan adyuvantes apropiados para una óptima estimulación de las respuestas (Alu *et al.* 2022).

3.7.4. Vacunas españolas

Varios laboratorios y grupos de investigación españoles se han sumado a la tarea de desarrollar vacunas candidatas frente a la COVID-19. De ellas, la vacuna Bimervax, elaborada por Hipra, es hasta la fecha la única que, tras superar los ensayos clínicos de fase III, ha sido autorizada por la EMA, como se describe en la sección 3.6.3.

En el Departamento de Biología Molecular y Celular, perteneciente al Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), el Grupo de Poxvirus y Vacunas, liderado por Mariano Esteban y Juan Francisco García Arriaza, poseía amplia experiencia en el uso del virus Vaccinia Ankara modificado (MVA, ver vectores virales en la sección 1.4.5) como vector vacunal; esta tecnología se aplicó al desarrollo de vacunas frente a la COVID-19. La vacuna denominada MVA-CoV2-S contiene el gen que codifica para la proteína S completa, optimizado con un codón humano, y se probó su eficacia en ratones modificados para expresar hACE2 (García-Arriaza *et al.* 2021; Lázaro-Frías *et al.* 2022), en hámsteres (Boudewijns *et al.* 2022) y en macacos Rhesus (Mooij *et al.* 2022).

En una versión posterior de la vacuna, designada como MVA-CoV2-S(3P), el gen de la proteína S optimizado portaba varias mutaciones para eliminar el sitio de escisión de la furina y para estabilizar la proteína en la configuración de prefusión; su inmunogenicidad se comprobó en ratones administrando una pauta de dos dosis, por vía intramuscular, y ya tras la primera dosis las respuestas de anticuerpos de clase IgG y de anticuerpos neutralizantes del virus original de Wuhan y de sus variantes fueron superiores a las obtenidas con la anterior versión MVA-CoV2-S; además, una única dosis de MVA-CoV2-S(3P), por vía intramuscular, fue capaz de proteger al 100 % de ratones transgénicos portadores de hACE2 (Pérez *et al.* 2022b). Posteriormente, se demostró que la vacuna MVA-CoV2-S(3P), también denominada MVA-S(3P), administrada por vía intramuscular en pauta de dos dosis, es inmunogénica y protectora en hámsters (Abdelnabi *et al.* 2023). Es importante señalar que ambas vacunas, administradas a ratones en una única dosis por vía intranasal, indujeron respuestas de IgG e IgA mucosal y protegieron a ratones hACE2 de la infección intravenosa con SARS-CoV-2, si bien MVA-CoV2-S(3P) fue más inmunogénica y eficaz (Pérez *et al.* 2022a). Dada su excelente eficacia, MVA-CoV2-S(3P) o MVA-S(3P) ha sido patentada por el CSIC en julio de 2023 para ser fabricada por la empresa española Biofabri.

La aparición de variantes del virus original de Wuhan que acumulan mutaciones en la proteína S causa una progresiva pérdida de eficacia de las vacunas. Partiendo del concepto de que las vacunas polivalentes son menos vulnerables a la deriva antigénica y a la evasión viral que las vacunas monovalentes, miembros de varios grupos y departamentos del CSIC diseñaron una proteína sintética que contiene un número de epítopos presentes en las proteínas S, M y N del SARS-CoV-1, a la que denominaron CoV2-BMEP, la cual se elaboró desde dos plataformas: como vacuna DNA (en forma del plásmido pcDNA-CoV2-BMEP) y utilizando como vector el virus vaccinia Ankara modificado (MVA-CoV2-BMEP) (Perdiguero *et al.* 2023). Para la elección de los componentes virales se establecieron criterios de inclusión de epítopos dominantes y con bajas tasas de mutación, es decir, relativamente conservados, reconocibles por células B y T (tanto T $CD4^+$ como T $CD8^+$ y, por tanto, presentables

por una amplia gama de polimorfismos HLA-II y HLA-I, respectivamente), y de exclusión de epítopos irrelevantes, cuya presencia en las vacunas podría ser inconveniente. Ambas vacunas, DNA-CoV2-BMEP y MVA-CoV2-BMEP, se ensayaron en ratones por vía intramuscular en regímenes de dosis, homólogos y heterólogos, e indujeron respuestas de anticuerpos y de inmunidad celular, siendo el régimen homólogo con dos dosis de MVA-CoV2-BMEP el más inmunogénico; en el modelo de infección de ratones hACE2, esta pauta confirió una protección parcial, y el suero de los animales protegidos fue capaz de neutralizar *in vitro* variantes del SARS-CoV-2, incluyendo Ómicron (Perdiguero *et al.* 2023). Este trabajo muestra las posibilidades de obtener una nueva generación de vacunas que puedan ser efectivas frente a diversas variantes del virus.

En el mismo Departamento de Biología Molecular y Celular del CSIC, el Grupo de Coronavirus, codirigido por Luis Enjuanes e Isabel Sola, llevaba años trabajando en el diseño de posibles vacunas frente al SARS y el MERS utilizando una plataforma de replicones de RNA autoamplificantes. Estos replicones contienen, además de la secuencia que codifica para el antígeno vacunal, una maquinaria de replicación que incluye la RNA-polimerasa dependiente de RNA que permite que las células que los incorporan produzcan un gran número de copias intracelulares de los mismos (ver la evolución de las vacunas de mRNA en la sección 1.4.7). Mediante la deleción del gen E del MERS-CoV, el equipo de Enjuanes y Sola generó un mutante defectivo en la propagación pero capaz de replicación intracelular; mutaciones adicionales en genes accesorios reforzaban la seguridad del replicón, que sin embargo retenía la capacidad de proteger a ratones frente a la infección (Gutiérrez-Álvarez *et al.* 2021). Este tipo de vacunas pueden considerarse en una categoría intermedia entre los virus atenuados y las vacunas de mRNA autoamplificante, ya que proceden de virus cuyos genomas han sido sometidos a deleciones para eliminar su virulencia (al impedir su propagación de células infectadas a células sanas), pero conservan genes de varios antígenos virales distintos, además de la maquinaria autorreplicativa. Científicos de este Grupo han empleado una tecnología similar se ha utilizado para generar replicones de RNA derivados del SARS-CoV-2, como candidatos a vacunas: por su capacidad autoamplificante, las dosis inmunizantes son muy bajas; inducen respuestas específicas, tanto de anticuerpos como de células T, frente a distintos antígenos del virus, además de la proteína S; se administran por vía intranasal, con lo que aseguran inmunidad no solo sistémica, sino también a nivel de la mucosa respiratoria; todo ello podría conducir a una autentica «inmunidad esterilizante», que no solo protegería de la enfermedad sino que impediría la infección y la transmisión del virus (https://www.vacunacovid.gob.es/voces-expertas/virus-frente-vacunas-una-batalla-evolutiva-que-debe-ganar-la-ciencia; https://www.vacunacovid.gob.es/voces-expertas/las-vacunas-espanolas-bien-situadas-en-la-carrera-mundial-que-es-de-fondo). Esta vacuna se encuentra aún en ensayos preclínicos.

El Grupo de Biología Molecular del Departamento de Biología Celular y Molecular (investigador principal, Vicente Larraga), perteneciente al Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas, del CSIC, está desarrollando una vacuna de DNA frente a la COVID-19. La vacuna consiste en dos plásmidos, uno de los cuales incorpora el gen de la proteína S estabilizada en prefusión (Sfs), mientras que el otro incorpora el gen de la proteína N. La elección de la proteína N se basó en su menor variabilidad y su capacidad para inducir inmunidad protectora. El vector plasmídico utilizado (pPAL) no es replicativo y carece de genes de resistencia a antibióticos y ha sido desarrollado por el mismo Grupo para la elaboración de una vacuna para prevención de la leishmaniasis (Alcolea *et al.* 2019). La vacuna pPAL-Sfs + pPAL-N, administrada por electroporación intramuscular en dos dosis, con un intervalo de 15 días, indujo una respuesta de anticuerpos neutralizantes y de inmunidad celular en ratones y protegió completamente a ratones transgénicos para hACE2 frente a una dosis letal de SARS-CoV-2 (Alcolea *et al.* 2022).

3.8. Regímenes de vacunación heterólogos

La mayoría de las vacunas diseñadas frente a la COVID-19 proponen pautas iniciales de dos dosis, separadas por un intervalo de tiempo de varias semanas. Es lo que se conoce como un régimen homólogo, en el que las dos dosis son de la misma vacuna, o de «*prime-boost*», refiriéndose *prime* a la primera dosis y *boost* a la segunda. La combinación de dos vacunas distintas para el mismo patógeno, una para la primera dosis y otra para la segunda, constituye un régimen heterólogo. Los regímenes heterólogos se han ensayado frente a infecciones en las que las interacciones con el sistema inmune son complejas y es difícil conseguir una inmunidad protectora, siendo quizás el ejemplo más relevante algunas pautas de vacunación ensayadas frente al *Lentivirus* humano 1 causante del SIDA (Excler y Kim 2019). En el caso de las vacunas frente a la COVID-19, las propuestas de regímenes heterólogos surgieron con el doble objetivo de mitigar la escasez intermitente de suministros y mejorar la inmunogenicidad y la seguridad (Hillus *et al.* 2021).

Las primeras evidencias científicas sobre la validez de los regímenes heterólogos frente a la COVID-19, buscando maximizar los beneficios de la vacunación, se obtuvieron comparando las respuestas inmunitarias en

ratones sometidos a combinaciones homólogas y heterólogas de cuatro vacunas, dos de ellas autorizadas por EUL (Ad5-nCoV de Cansino y BBIBP-CorV de Sinopharm), otra en proceso de autorización (ZF2001 de Zhifei) y una última aún no autorizada (ARcoVax de Walvax); es decir, una vacuna de vector adenoviral, una vacuna de virus entero inactivado, una vacuna subunidad de RBD recombinante y una vacuna de mRNA, respectivamente. Globalmente, se demostró que la estrategia heteróloga consistente en una primera dosis de vacuna de vector adenoviral seguida de una segunda dosis con cualquiera de las otras tres vacunas mejoró los niveles de anticuerpos neutralizantes y las respuestas de células T sesgadas hacia Th1 (He *et al.* 2021).

Algunos casos de trombosis (ver la sección 3.10.1) en sujetos vacunados con la vacuna de vector adenoviral ChAdOx1 nCov-19 (Vaxzevria, de AstraZeneca) fueron el motivo de que en varios países se propusiera a las personas que habían recibido una primera dosis de esta vacuna la posibilidad de completar la pauta con una segunda dosis de una vacuna de mRNA. Un estudio inicial en humanos realizado en el Reino Unido reportó un porcentaje mayor de reactogenicidad sistémica (fiebre, escalofríos, artralgias, mialgias) en el régimen heterólogo de ChAdOx1 nCoV-19 seguida de BNT162b2 que en los correspondientes homólogos, si bien estas manifestaciones adversas desaparecieron generalmente a las 48 h de la segunda dosis (Shaw *et al.* 2021). Otro estudio, en Alemania, comparando el régimen homólogo de dos dosis de ChAdOx1 nCov-19 con un intervalo de 10 a 12 semanas, el régimen homólogo de dos dosis de la vacuna BNT162b2 (Comirnaty, de Pfizer/BioNTech) con un intervalo de tres semanas y el régimen heterólogo de una primera dosis de ChAdOx1 nCov-19 y una segunda de BNT162b2 con un intervalo de 10 a 12 semanas demostró una reactogenicidad similar en los tres regímenes, pero una inmunogenicidad superior en el heterólogo, medida por los niveles de anticuerpos neutralizantes y por la respuesta de células T productoras de IFN-γ (Hillus *et al.* 2021). Un estudio similar, también en Alemania, coincidió en una respuesta superior, tanto de anticuerpos como de células Th1 en sujetos que recibieron el régimen heterólogo de ChAdOx1 nCoV-19 seguida de BNT162b2 que en los que recibieron el régimen homólogo de dos dosis de ChAdOx1 nCoV-19 (en este ensayo, las respuestas del régimen homólogo de dos dosis de BNT162b2 fueron similares a las del heterólogo); sin embargo, la respuesta de células T $CD8^+$ específicas fue superior con el régimen heterólogo que con cualquiera de los dos homólogos; y la reactogenicidad del régimen heterólogo se consideró aceptable (Schmidt *et al.* 2021). También se demostró que la mayor inmunogenicidad del régimen heterólogo de ChAdOx1 nCoV-19 seguida de BNT162b2 proporcionó una protección frente a los efectos de la infección por SARS-CoV-2 superior a la de los regímenes homólogos y se sugirió su recomendación para vacunar a pacientes inmunocomprometidos (Pozzetto *et al.* 2021). Se han sucedido estudios en este sentido, encontrándose que los diversos regímenes heterólogos examinados mostraron una reactogenicidad aceptable y generalmente una inmunogenicidad superior a la de los correspondientes regímenes homólogos (Sapkota *et al.* 2022). Una revisión de estos estudios fue publicada por la OMS el 16 de diciembre de 2021 (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/350635/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-recommendation-heterologous-schedules-2021.1-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

En España, el 18 de mayo de 2021 se acordó proponer la vacunación de segunda dosis con la vacuna de mRNA Comirnaty a las personas que hubiesen recibido una primera dosis de Vaxzevria, reconociendo así las ventajas de los regímenes heterólogos (Actualización 8 de la Estrategia de vacunación frente a COVID-19 en España, elaborada por el Grupo de Trabajo Técnico de Vacunación COVID-19, de la Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones, https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_Estrategia_Vacunacion/docs/COVID-19_Actualizacion8_EstrategiaVacunacion.pdf).

La necesidad de contrarrestar la progresiva disminución de los niveles de anticuerpos y de mejorar la protección frente a las variantes del virus llevó a introducir las dosis de refuerzo, administradas periódicamente después de haber completado las pautas iniciales de dos dosis. También en estos casos parece superior la inmunogenicidad cuando la dosis de refuerzo es heteróloga (Wang *et al.* 2022b). Se ha propuesto a las vacunas de mRNA como las más recomendables para las dosis de refuerzo heterólogo aplicables a personas que han recibido pautas de inmunización con otros tipos de vacunas, especialmente si en la pauta inicial de dos dosis se usaron vacunas inactivadas como CoronaVac, por la menor actividad de estas frente a las nuevas variantes del virus (Kyaw *et al.* 2023). Esto fue recogido ya en la Actualización 9 de la Estrategia de vacunación frente a COVID-19, de 2 de noviembre de 2021 (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_Estrategia_Vacunacion/docs/COVID-19_Actualizacion9_Modificada_EstrategiaVacunacion.pdf). En España, se publicaron recomendaciones más recientes sobre la dosis de refuerzo y otros aspectos de la vacunación en la Actualización 11 de la Estrategia de Vacunación frente a COVID-19 (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_Estrategia_Vacunacion/

docs/COVID-19_Actualizacion11_EstrategiaVacunacion.pdf) y en las Recomendaciones de Vacunación del 22 de septiembre de 2022 (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Historico_COVID-19/docs/Recomendaciones_vacunacion_Otono_Covid_VF.pdf) y del 12 de septiembre de 2023, esta última dedicada conjuntamente a vacunación frente a COVID-19 y gripe (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/gripe_covid19/docs/RecomendacionesVacunacion_Gripe-Covid19.pdf).

3.9. Vacunación frente a COVID-19 en situaciones especiales

3.9.1. Embarazo

El embarazo es un proceso dinámico a lo largo del cual se producen múltiples cambios fisiológicos, algunos de los cuales influyen en el sistema inmune. Por ejemplo, los aumentos de los niveles de estradiol y progesterona potencian el componente de células Th2 a expensas del Th1 en las respuestas específicas (Omer 2017). Además, los factores que actúan sobre la mujer gestante pueden afectar al embrión o al feto. Estas influencias se extienden al posparto y el período de lactancia del bebé (Dodd *et al.* 2021). Por ello, es necesario prestar una atención especial a la evaluación de la seguridad y la eficacia de las vacunas administradas durante el embarazo. Sin embargo, la preocupación por la responsabilidad que se derivaría de los posibles efectos adversos hace que las mujeres embarazadas sean excluidas de las primeras fases de los ensayos clínicos de vacunas y fármacos (Shimabukuro *et al.* 2021; Mutanga *et al.* 2022).

La infección de mujeres gestantes con el SARS-CoV-2 cursa con mayor porcentaje de casos graves y tasas de mortalidad más elevadas, y por otra parte incrementa el riesgo de resultados adversos como el parto prematuro (Shimabukuro *et al.* 2021; Joubert *et al.* 2022). Se trata por tanto de un colectivo claramente beneficiario de la vacunación, pero, como se ha indicado, el embarazo ha sido criterio de exclusión para la participación en los ensayos clínicos de las vacunas frente a la COVID-19; no obstante, en los primeros ensayos de vacunas de mRNA y de vector adenoviral hubo pequeños porcentajes de mujeres embarazadas, ya fuese porque no se detectó el embarazo en el inicio del ensayo o porque ocurrió con posterioridad, y el seguimiento de estos casos no evidenció ningún efecto adverso sobre la salud de la madre, el desarrollo fetal/embrionario o el desarrollo posnatal (Blumberg *et al.* 2021; Joubert *et al.* 2022). Se han reportado casos de aborto y parto prematuro en mujeres vacunadas, pero no hay evidencias de que las probabilidades de que ocurran se vean incrementadas por la vacunación (Li *et al.* 2022). Estudios posteriores con grupos mayores de mujeres gestantes confirmaron la ausencia de diferencias significativas en las complicaciones intraparto o los resultados perinatales entre las mujeres que se vacunaron durante el embarazo y las que no lo hicieron, respaldando la seguridad de la vacunación contra la COVID-19 durante el embarazo (Blakeway *et al.* 2022; De Rose *et al.* 2022; Li *et al.* 2022). Adicionalmente, se ha comprobado la presencia de anticuerpos neutralizantes en sangre de cordón umbilical de recién nacidos de madres vacunadas durante la gestación, como resultado de la transferencia de IgG materna a través de la placenta (De Rose *et al.* 2022). Es interesante reseñar que en un período de hasta 48 h después de la inmunización con las vacunas Comirnaty y Spikewax no se detectó el mRNA vacunal en la leche materna, pero en cambio después de tres a cuatro semanas aparecieron en la leche anticuerpos de la clase IgA específicos para la proteína S, que pudieran tener algún efecto protector para el lactante (datos recogidos por Joubert *et al.* 2022).

En España, la Actualización n.º 7 de la Estrategia de vacunación frente a COVID19 elaborada por el Grupo de Trabajo Técnico de Vacunación COVID-19, de la Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones, con fecha de 11 mayo de 2021, se hacía eco de los primeros reportes que no revelaban efectos adversos de la vacunación durante la gestación y, en consecuencia, proponía vacunar a las mujeres embarazadas o en período de lactancia con vacunas de mARN cuando les correspondiese. Posteriormente (2 de noviembre de 2021), la Actualización n.º 9 modificada ratificó esta propuesta, recordando que el riesgo de COVID grave es mayor en las mujeres embarazadas, y que también es mayor la incidencia de parto prematuro, preeclamsia y eventos trombóticos; en este documento se recogen las recomendaciones de la Comisión de Salud Pública del CISNS sobre Vacunación frente a COVID-19 en Mujeres Embarazadas de 3 de agosto de 2021:

1. Se recomienda la vacunación frente a COVID-19 a las mujeres embarazadas. La vacuna evita complicaciones durante el embarazo, especialmente, si existen factores de mayor riesgo como pueden ser obesidad, edad mayor de 35 años, hipertensión arterial, diabetes o preeclampsia.
2. No existe contraindicación para la vacunación frente a COVID-19 en ningún trimestre del embarazo.
3. Se debe facilitar que las mujeres embarazadas lleguen completamente vacunadas al período de máximo riesgo de complicaciones en caso de infección por COVID-19 (finales del 2.º trimestre y 3.er trimestre del embarazo).
4. Se debe priorizar la vacunación de las mujeres embarazadas por su mayor riesgo frente a COVID-19

fomentando estrategias de captación específicas para mujeres embarazadas.
5. Se utilizarán vacunas de ARNm, independientemente de la edad de la gestante. Si la mujer tiene un esquema incompleto con Vaxzevria se completará la pauta con una vacuna de ARNm.
6. Es importante también que las personas del entorno de la embarazada estén correctamente vacunadas frente a COVID-19 y que, tanto embarazadas como convivientes, refuercen las medidas de prevención: Limitar al máximo los contactos; usar mascarilla; lavarse las manos; ventilar los espacios; mantener la distancia interpersonal; evitar las aglomeraciones.
7. Si se está planificando un embarazo, es conveniente completar la vacunación antes.
8. Puede consultar el mejor momento para vacunarse con su profesional sanitario.

Además, la Actualización n.º 9 modificada recuerda que en la leche de madres que recibieron vacunas de mRNA no se encontraron componentes de las vacunas, pero si aparecieron anticuerpos que pudieran tener algún efecto protector en los lactantes, por lo que se recomienda la administración de vacunas de mRNA a las mujeres en período de lactancia (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_Estrategia_Vacunacion/docs/COVID-19_Actualizacion9_Modificada_EstrategiaVacunacion.pdf).

3.9.2. *Pacientes sometidos a terapias inmunosupresoras*

Los pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores tienen un riesgo mayor de desarrollar formas más graves de COVID-19, con mayores tasas de mortalidad (Galmiche *et al.* 2022; Mohseni Afshar *et al.* 2022). Este grupo, que incluye a personas con enfermedades autoinmunes, ya sean sistémicas u organoespecíficas, y a receptores de trasplantes alogénicos, debe considerarse entre los prioritarios para la vacunación, pero generalmente es excluido de los ensayos clínicos de las vacunas candidatas. Sin embargo, dado que las terapias inmunosupresoras pueden afectar las respuestas inmunitarias celulares y humorales, es necesario examinar los efectos de las vacunas en estos pacientes.

En el caso de los corticoides, sus efectos supresores sobre las respuestas de anticuerpos dependen de la dosis. Para otras vacunas se ha descrito que dosis de prednisolona superiores a 10 mg diarios (o dosis equivalentes de otros corticoides), afectan negativamente a la producción de anticuerpos; en consecuencia, debe considerarse reducir la dosis de corticoides alrededor del momento de la vacunación (Mohseni Afshar *et al.* 2022).

Los medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, de «*Disease-modifying antirheumatic drugs*») incluyen agentes inmunosupresores y antiinflamatorios como metotrexato, hidroxicloroquina, sulfasalazina, ciclofosfamida, micofenolato y azatioprina, y aunque todos ellos pueden disminuir las respuestas de anticuerpos, solo metotrexato y ciclofosfamida las reducen por debajo de los niveles considerados necesarios para que las vacunas aseguren seroprotección; algunos autores han propuesto suspender los tratamientos con estos DMARDs durante un período de dos semanas antes y dos semanas después de la vacunación, pero habrá que valorar en cada caso la posible recidiva o agravamiento de la enfermedad autoinmune subyacente (Mohseni Afshar *et al.* 2022). Los DMARDs biológicos (anticuerpos monoclonales que neutralizan citocinas como el TNF-α, antagonistas de citocinas, inhibidores de vías de señalización intracelulares...) pueden tener efectos negativos sobre las respuestas de anticuerpos (más severos si se administran asociados a metotrexato), por lo que en cada caso debe controlarse la suspensión temporal de la medicación (Mohseni Afshar *et al.* 2022).

La tasa de falta de respuesta asociada a terapias inmunosupresoras varía ampliamente y es mayor en los receptores de trasplantes de órganos sólidos, especialmente de pulmón y riñón (Galmiche *et al.* 2022). En el caso de los receptores de trasplantes de órganos sólidos, se aconseja posponer la primera dosis de vacuna hasta tres meses después de la fecha de realización del trasplante; si el paciente ya recibió la primera dosis antes del trasplante, la recomendación es retrasar la segunda dosis al menos cuatro semanas después (Heldman y Limaye 2021). Una tercera dosis de refuerzo podría mejorar mucho las respuestas en este colectivo (Mohseni Afshar *et al.* 2022).

Los receptores de trasplantes alogénicos plantean un problema adicional: usualmente la vacuna (y con mayor intensidad si contiene adyuvantes) induce una reacción inflamatoria inespecífica, que aunque es local, puede tener repercusiones sistémicas que potencien las respuestas frente a los aloantígenos del tejido trasplantado. Ciertamente, las vacunas de mRNA y las vectorizadas por adenovirus no contienen adyuvantes; pero los sistemas de administración de nanopartículas lipídicas usados con las vacunas de mRNA tienen actividad adyuvante y los vectores adenovirales inducen potentes reacciones de inmunidad innata; sin embargo, los datos disponibles no han revelado una mayor incidencia de episodios de rechazo agudo atribuible a la vacunación frente a la COVID-19 (Heldman y Limaye 2021).

La hoja de ruta establecida por el «*Strategic Advisory Group of Experts on Immunization*» (SAGE) de la OMS, actualizada a 21 de enero de 2022, incluye a las personas «modera y gravemente inmunodeprimidas» en el grupo

de mayor prioridad para la vacunación y añade que, dada su menor capacidad de respuesta, están indicadas en estos casos las dosis adicionales de refuerzo (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/351946/WHO-2019-nCoV-Vaccines-SAGE-Prioritization-2022.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

En España, la Actualización n.º 11 de la Estrategia de vacunación frente a COVID19 (Grupo de Trabajo Técnico de Vacunación COVID-19, Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones), del 8 de febrero de 2022, señala que en los grupos de población con inmunosupresión grave, ya sea por su patología de base o por recibir terapias inmunosupresoras, la vacunación frente a COVID-19 no garantiza que se alcancen niveles de respuesta que protejan frente a la enfermedad, por lo que se sugiere como alternativa la inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_Estrategia_Vacunacion/docs/COVID-19_Actualizacion11_EstrategiaVacunacion.pdf).

3.9.3. Pacientes con cáncer

Los pacientes con cáncer que se infectan con SARS-CoV-2 tienen un riesgo mucho mayor de COVID-19 grave y tasas más altas de mortalidad que la población sin comorbilidades (Fendler *et al.* 2022). Sin embargo, el deterioro del sistema inmunitario, debido al propio proceso de la enfermedad neoplásica y a los efectos adversos inmunosupresores de la mayoría de las terapias anticancerosas, resta eficacia a la vacunación (Fendler *et al.* 2022). Los pacientes con cánceres hematológicos y, en especial, con leucemia linfoide crónica, figuran entre los que peor responden a la vacunación (Corti *et al.* 2022; Piechotta *et al.* 2022). En lo que se refiere al efecto de los tratamientos, los pacientes que reciben terapias dirigidas contra marcadores de células B (tratamientos reductores de células B) son los que peores respuestas de anticuerpos muestran, aunque sus respuestas de inmunidad celular son potentes (Corti *et al.* 2022; Piechotta *et al.* 2022). No se han reportado efectos adversos de la vacunación distintos de los habituales, al menos para vacunas de mRNA en pacientes con cáncer de mama y de pulmón (Li *et al.* 2022). Se recomiendan las dosis de refuerzo, posteriores a la pauta de dos dosis, para mejorar las tasas de seroconversión (Corti *et al.* 2022; Fendler *et al.* 2022; Piechotta *et al.* 2022).

3.9.4. Otros grupos de riesgo

Las personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) presentan manifestaciones más graves de la COVID-19, siendo mayor el riesgo de gravedad cuanto menor sea el nivel de células T $CD4^+$ (que es la célula diana del VIH); aunque hay pocos informes sobre la eficacia de las vacunas frente a la COVID-19 en estos pacientes, los datos existentes sugieren que las vacunas de mRNA son seguras e inmunógenas (Mohseni Afshar *et al.* 2022). Sujetos infectados con VIH que recibieron terapia antirretroviral mostraron buenas respuestas a una vacuna de vector adenoviral (Li *et al.* 2022).

La obesidad y las afecciones asociadas, como la hipertensión, la enfermedad renal crónica, la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares, son condiciones que incrementan el riesgo de padecer una COVID-19 grave (Muskiet *et al.* 2022). La obesidad se asocia con respuestas de anticuerpos significativamente menores a vacunas frente a COVID-19, en comparación con individuos sin sobrepeso; el tejido adiposo visceral hiperdesarrollado causa un estado de inflamación crónica que deteriora el sistema inmunitario y afecta negativamente a las respuestas de anticuerpos y de inmunidad celular (Kara *et al.* 2022). Hay algunas evidencias de que las vacunas de mRNA pueden ser recomendadas de forma preferente en esta población (Kara *et al.* 2022).

3.10. Efectos adversos graves asociados o atribuidos a vacunas frente a COVID-19

Los efectos adversos más frecuentes de las vacunas frente a la COVID-19 son leves y similares a los de otras muchas vacunas. Puede afirmarse que las vacunas contra la COVID-19 parecen extremadamente seguras (Angeli *et al.* 2023). En su artículo de divulgación fechado a 31 de marzo de 2021, la OMS enumera como efectos adversos comunes dolor en el lugar de inyección, fiebre, cansancio, cefaleas, mialgias, escalofríos y diarrea (https://www.who.int/es/news-room/feature-stories/detail/side-effects-of-covid-19-vaccines). Con mayor o menor detalle, vienen a ser los mismos que recogen las fichas técnicas y prospectos de las vacunas comercializadas, disponibles en https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html: efectos locales como sensibilidad, dolor, hinchazón en el lugar de inyección; y sistémicos como escalofríos, fiebre, cansancio, artralgias, mialgias, linfoadenopatías, cefalea, náuseas y malestar. En su mayoría son reacciones leves y transitorias, que desaparecen tras los primeros días después de la vacunación.

La AEMPS ha emitido hasta 19 informes de farmacovigilancia sobre vacunas COVID; los 9 primeros (desde enero hasta octubre de 2021) pueden consultarse en la dirección https://www.aemps.gob.es/?s=Farmacovigilancia+sobre+vacunas+COVID-19; los siguientes informes (de noviembre de 2021 a enero de 2023), en https://www.aemps.gob.es/page/2/?s=Farmacovigilancia%20sobre%20vacunas%20COVID-19. Según el 19.º Informe

de Farmacovigilancia sobre Vacunas COVID-19, publicado por la AEMPS el 19 de enero de 2023 (https://www.aemps.gob.es/informa/19o-informe-de-farmacovigilancia-sobre-vacunascovid-19/), los datos proporcionados por el Sistema Español de Farmacovigilancia de Medicamentos de Uso Humano indican que desde el inicio de la campaña de vacunación hasta el 31 de diciembre de 2022 se han administrado en España 111.293.866 dosis de vacunas frente a la COVID-19, que corresponden a un total de 41.310.204 personas que recibieron al menos una dosis; la distribución por vacunas fue 60,4 % de Comirnaty original, 21,7 % de Spikevax original, 8,8 % de Vaxzevria, 7,1 % de Comirnaty bivalente (original/Ómicron BA.4-5), 1,8 % de Jcovden y 0,2 % de Spikevax bivalente (original/Ómicron BA.1). En ese período de tiempo, se han registrado en la base de datos FEDRA (Farmacovigilancia Española, Datos de Reacciones Adversas) un total de 84.650 notificaciones de acontecimientos adversos, de los que 14.003 fueron consideradas graves (requirieron o prolongaron la hospitalización, o tuvieron consecuencias clínicamente significativa) y de estas 500 tuvieron como resultado el fallecimiento. El informe considera necesario aclarar que en muchos casos no ha establecido una relación causal con las vacunas, por lo que no se pueden categorizar como auténticos efectos adversos (en muchos de los casos notificados en los que se dispone de información sobre los antecedentes médicos y la medicación concomitante, el fallecimiento se puede explicar por la situación clínica previa del paciente).

Diversas situaciones clínicas graves se vienen estudiando por su posible relación con las vacunas frente a la COVID-19: eventos cardiovasculares y hemostáticos (isquemia cardíaca, accidentes cerebrovasculares, tromboembolismo arterial, tromboembolismo venoso, miocarditis y/o pericarditis, trombocitopenia y trastornos de la coagulación), síndrome de Guillain-Barré, parálisis de Bell, mielitis transversa, encefalomielitis o encefalitis, narcolepsia, anafilaxia, apendicitis (Andersson *et al.* 2022). En los apartados siguientes, se aporta información sobre algunas de estas situaciones cuya posible asociación con las vacunas frente a la COVID-19 ha podido crear alarma social.

3.10.1. Trombosis con trombocitopenia

Para comprender este efecto adverso descrito para vacunas de vector adenoviral frente a la COVID-19, es necesario conocer una complicación que puede aparecer en pacientes tratados con heparina, denominada trombocitopenia inducida por heparina (TIH, en inglés, «*heparin-induced thrombocytopenia*» o HIT). La heparina, con carga negativa, tiene alta afinidad por el factor plaquetario 4 (PF4), una proteína cargada positivamente, presente en gránulos y superficie de las plaquetas; al unirse y formar un complejo PF4/heparina (también designado como PF4/polianión), PF4 experimenta un cambio conformacional que expresa nuevos epítopos, a los que pueden unirse autoanticuerpos; los inmunocomplejos formados por estos autoanticuerpos, de clase IgG, y los complejos PF4/heparina activan a las plaquetas, propiciando la liberación de mediadores de coagulación y la propia depleción de plaquetas (trombocitopenia); también activan a los monocitos, causado daño tisular que favorece la trombosis (Cruz-González *et al.* 2007).

El 9 de marzo de 2021 se señalaron 17 casos de trombocitopenia inmunitaria en individuos tras administración de vacunas de mRNA, lo que suscitó alarma pública, aunque los autores de la publicación señalaban que no era posible establecer una relación causal entre la inmunización con dichas vacunas y la trombocitopenia (Lee *et al.* 2021). El 7 de abril de 2021, la EMA comunicó en una conferencia de prensa virtual las conclusiones sobre una evaluación de una señal de seguridad con Vaxzevria sobre casos de eventos tromboembólicos, concluyendo que podían considerarse efectos adversos muy raros de la vacuna; en una nota posterior (23 de abril), la Agencia reconoció que se habían comunicado casos muy raros de coágulos de sangre con niveles de plaquetas bajos después de la vacunación con Vaxzevria, pese a lo cual se establecía claramente que los beneficios de la vacuna superaban los riesgos en adultos de todos los grupos de edad. En efecto, con posterioridad los acontecimientos de tromboembolismo se han adjudicado, aunque con frecuencia bajísima, a las vacunas vectorizadas por adenovirus (en cuyas fichas técnicas y prospectos se han incluido) y no a las vacunas de mRNA, lo que ya se recoge en la Actualización n.º 9 modificada de la Estrategia de Vacunación frente a COVID19 de 2 de noviembre de 2021 (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_Estrategia_Vacunacion/docs/COVID-19_Actualizacion9_Modificada_EstrategiaVacunacion.pdf).

La alarma creada por las primeras comunicaciones de casos de VITT aparentemente asociados a la vacunación con Vaxzevria llevó a su suspensión temporal en varios países; en España, por el Ministerio de Sanidad, desde el 16 al 23 de marzo de 2021. Los primeros artículos en revistas científicas sobre casos de trombosis con trombocitopenia aparentemente asociados con la administración de Vaxzevria se publicaron en versión electrónica el 9 de abril de 2021. En uno de ellos se informó de cinco individuos que presentaron trombosis venosa y trombocitopenia entre los 7 y los 10 días después de recibir la primera dosis de ChAdOx1 nCoV-19, tres de los cuales fallecieron como consecuencia de hemorragia cerebral; todos ellos tenían niveles altos de anticuerpos de clase IgG frente a

los complejos de PF4/ polianión (Schultz *et al.* 2021). El otro describió 11 pacientes que desarrollaron complicaciones trombóticas con trombocitopenia entre 5 y 16 días tras Vaxzevria, seis de ellos con desenlace fatal; los inmunoensayos para anticuerpos anti PF4/polianión fueron positivos en todos los casos en que se realizaron (Greinacher *et al.* 2021). La trombosis con trombocitopenia se consideró como una complicación rara de la inmunización con las vacunas Vaxzevria y Jcovden, basadas ambas en vectores adenovirales, y su mecanismo, consistente en la activación de plaquetas por anticuerpos de clase IgG dirigidos contra el complejo PF4/polianión (anticuerpos que desaparecen tras la recuperación de los enfermos), es el mismo de la trombocitopenia autoinmune inducida por heparina descrita al inicio de este apartado, con la que comparte asimismo sus manifestaciones clínicas (Thiele *et al.* 2021; Kanack *et al.* 2022). Lo que cambia entre ambas entidades clínicas es la naturaleza del polianión, que en el caso de la trombosis posvacunal con trombocitopenia podrían ser componentes bacterianos, como fracciones de pared o DNA extracelular; esto explicaría la propensión de los trombos a localizarse en los senos cavernosos cerebrales y en el territorio venoso intestinal, que recogen el drenaje venoso de áreas ricas en microbiota como la nasofaringe y los intestinos, respectivamente (McGonagle *et al.* 2021).

La trombosis posvacunal con trombocitopenia ha sido denominada «trombocitopenia trombótica inmune inducida por la vacuna» («*vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia*» o VITT), «síndrome de trombosis con trombocitopenia» («*thrombosis with thrombocytopenia syndrome*», TTS) y «trombocitopenia inmune protrombótica inducida por la vacuna» («*vaccine-induced prothrombotic immune thrombocytopenia*», VIPIT) y se han definido cinco criterios para su diagnóstico definitivo: desarrollo de síntomas entre 4 y 42 días después de la administración de la vacuna frente a la COVID-19; trombosis venosa o arterial en cualquier localización anatómica; trombocitopenia (recuento de plaquetas inferior a 150×10^9/L); presencia de anticuerpos frente al complejo PF4/polianión, demostrables por inmunoensayo; y dímero D elevado al menos cuatro veces sobre el límite superior normal (Sunder *et al.* 2022).

Las sucesivas actualizaciones de seguridad emitidas por EMA han ido recogiendo la información acumulada sobre los posibles efectos adversos de las vacunas frente a COVID-19. En la actualización de 29 de marzo de 2021 (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-29-march-2021_en.pdf) se señalaba que el número de casos notificados de tromboembolismos después de la vacunación con Vaxzevria en relación con el número de personas vacunadas fue menor que la incidencia en la población general, pero admitía una posible asociación (aunque por el momento no demostrada) de esta vacuna con casos muy raros trombosis en combinación con trombocitopenia, advertencia que se incluyó en la información sobre Vaxzevria. Posteriormente, la actualización de 14 de abril de 2021 (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-14-april-2021_en.pdf) concluyó que es admisible la existencia de una relación causal entre la vacunación con Vaxzevria y casos muy raros de trombosis junto con trombocitopenia, a veces acompañada de hemorragia, por lo que se acordó que la información del producto se actualizase especificando la trombocitopenia como un nuevo efecto secundario común (que ocurre en menos de 1 de cada 10 personas) y la trombosis en combinación con trombocitopenia como un nuevo efecto secundario muy raro (que ocurre en menos de 1 en 10.000 personas). En esa misma fecha (14 de abril), la actualización de seguridad sobre la vacuna Jcovden planteaba el estudio del posible riesgo (no confirmado) de trombosis con trombocitopenia tras la administración de esta vacuna (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-covid-19-vaccine-janssen-14-april-2021_en.pdf) y el 22 de abril se decidía la inclusión de la trombosis con trombocitopenia como un nuevo efecto adverso raro de la vacuna de Janssen (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-covid-19-vaccine-janssen-22-april-2021_en.pdf). La actualización del 21 de mayo de 2021 sobre Vaxzevria (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-21-may-2021_en.pdf) incluía una contraindicación para no vacunar con esta vacuna a personas que hubiesen presentado trombocitopenia después de una dosis anterior de la misma. En las actualizaciones del 14 de julio 2021 se recogieron 479 casos de sospecha de trombosis con trombocitopenia tras administración de Vaxzevria en países de la UE/EEE, de los cuales 100 fueron mortales, sobre un total de 51,4 millones de dosis de Vaxzevria administradas (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-14-july-2021_en.pdf), y 21 casos con 4 fallecimientos tras administración de Jcovden, sobre un total de 7 millones de dosis (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-covid-19-vaccine-janssen-14-july-2021_en.pdf). La actualización sobre

Vaxzevria emitida el 6 de octubre de 2021 (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-6-october-2021_en.pdf) señala que, siendo la trombocitopenia un efecto secundario común de esta vacuna e incluido como tal en su ficha técnica y prospectos, debe sin embargo agregarse a dicha información la variedad «trombocitopenia inmune» (debida a un mecanismo autoinmune), con «frecuencia desconocida». Esto plantea una nueva entidad, distinta de la trombosis asociada a trombocitopenia, como reconoció la AEMPS en la ya citada Actualización 9 modificada del 2 de noviembre (https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/vacunaciones/covid19/Actualizaciones_Estrategia_Vacunacion/docs/COVID-19_Actualizacion9_Modificada_EstrategiaVacunacion.pdf), que califica la trombocitopenia inmune como de frecuencia rara, que no varía el balance beneficio-riesgo de la vacuna como para modificar sus condiciones de autorización. Volviendo con las actualizaciones de seguridad de la EMA, la emitida el 20 de enero de 2022 (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccines-safety-update-20-january-2022_en.pdf) insiste en que la trombosis con trombocitopenia es un efecto adverso de frecuencia muy rara atribuido a las vacunas Vaxzevria y Jcovden, introduciendo algunas modificaciones menores en la redacción de la información sobre ambos productos. El Informe de Farmacovigilancia n.º 16 de la AEMPS, de 27 de julio de 2022, concluye que no hay evidencias de un aumento de riesgo de infarto de miocardio, embolismo pulmonar, o trombosis en general, tras la administración de Vaxzevria o de Jcovden (https://www.aemps.gob.es/informa/16o-informe-de-farmacovigilancia-sobre-vacunascovid-19/#index3.3).

3.10.2. Miocarditis y pericarditis

Aunque en los ensayos clínicos previos a la autorización de vacunas frente a la COVID-19 no se observaron efectos adversos de miocarditis ni pericarditis, se han registrado posteriormente informes de casos asociados a la administración de vacunas de mRNA que han justificado el estudio de estas complicaciones cardiológicas; lo escaso de su frecuencia ha sido la causa de que comenzaran a detectarse durante la vigilancia posterior a la autorización de las vacunas y no antes (Patone *et al.* 2022).

El miocardio es la capa muscular y la más gruesa de la pared del corazón, tapizada internamente por el endocardio (en contacto con la sangre) y externamente por las dos hojas del pericardio. Los términos miocarditis y pericarditis hacen referencia a la inflamación de miocardio y pericardio, respectivamente, que pueden deberse a causas infecciosas (principalmente de etiología viral), inmunopatológicas, medicamentosas u otras (Diccionario de Términos Médicos de la Real Academia Nacional de Medicina de España, https://dtme.ranm.es/index.aspx). Ya los primeros análisis de datos de las comunicaciones de miocarditis tras administración de vacunas de mRNA frente a la COVID-19 pusieron de manifiesto que, en todo caso, eran acontecimientos raros, habiéndose reportado por ejemplo, en una cohorte de 2.392.924 personas vacunadas una incidencia de 0,8 casos por millón de primeras dosis y 5,8 casos por millón de segundas dosis durante una observación de 10 días posvacunación, sin que ninguno de los casos reportados requiriese ingreso en UCI ni reingreso tras el alta médica (Simone *et al.* 2021). Se ha observado que la incidencia de miocarditis aguda tras la segunda dosis de vacunas de mRNA en varones adolescentes es significativamente mayor que la incidencia en la población general, con una sintomatología que remite con rapidez (Kato *et al.* 2022).

El análisis de las primeras notificaciones al respecto reveló que solo se comunicaban informes de miocarditis posvacunal tras la administración de las vacunas de mRNA, pero no de otras como las vectorizadas por adenovirus (Nota de seguridad de la AEMPS emitida con fecha 9 de julio de 2021 sobre «vacunas frente a la COVID-19: conclusiones de la evaluación del riesgo de miocarditis/pericarditis», https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/seguridad-1/2021-seguridad-1/vacunas-frente-a-la-covid-19-conclusiones-de-la-evaluacion-del-riesgo-de-miocarditis-pericarditis/), y así ha sido recogido posteriormente por diversos autores (Wang *et al.* 2022a). Sin embargo, en un estudio sobre 38.615.491 adultos que recibieron al menos una dosis de ChAdOx1 (Vaxzevria), BNT162b2 (Comirnaty) o mRNA-1273 (Spikevax) se registraron 1.615 y 1.574 casos de miocarditis y pericarditis, respectivamente (14 pacientes presentaron ambas patologías), concluyéndose que hubo un pequeño incremento en el riesgo de miocarditis dentro de una semana después de recibir la primera dosis de las tres vacunas (tanto la vectorizada por adenovirus como las dos de mRNA), y un riesgo mayor después de la segunda dosis de ambas vacunas de mRNA, especialmente en el caso de Spikevax (Patone *et al.* 2022). La heterogeneidad de los informes de casos individuales de miocarditis y pericarditis, Ling *et al.* (2022) han propuesto el término miopericarditis para englobar los casos de miocarditis, pericarditis o los casos con características de ambas patologías.

Ciertamente, la miocarditis se ha comunicado como efecto adverso de otras vacunas dirigidas frente a distintos patógenos. Considerando el conjunto de vacunas

autorizadas frente a la COVID-19 (y no solo las vacunas de mRNA), el riesgo de miocarditis es similar al observado con las vacunas frente a la gripe y significativamente menor que el reportado tras inmunización con el poxvirus vaccinia (Ling *et al.* 2022). Sin embargo, la incidencia de miocarditis y pericarditis en hombres jóvenes después de la administración de vacunas de mRNA fue más alta de lo esperado en comparación con otros grupos de edad o con otras vacunas (Ling *et al.* 2022). Se ha propuesto que la expresión transitoria, mediada por las vacunas de mRNA, de la proteína S en la superficie de los cardiomiocitos podría desencadenar una respuesta inmunitaria que causase daño e inflamación en el miocardio (Patone *et al.* 2022). Parece demostrado que la frecuencia de miocarditis es mayor tras la segunda dosis de las vacunas de mRNA; y es mayor con Spikevax que con Comirnaty: se han comunicado tasas de miocarditis por 100.000 vacunados de 1,6 y 2,1 para Comirnaty y 5,7 y 4,2 para Spikevax, en sendos estudios mencionados por Marschner *et al.* (2022). De hecho, en octubre de 2021 se suspendió cautelarmente la vacunación con Spikevax en países del norte de Europa, como recogía la AEMPS en su Nota de Seguridad de 07 de octubre de 2021 (https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/seguridad-1/2021-seguridad-1/suspension-de-la-vacunacion-frente-a-la-covid-19-con-spikevax-vacuna-de-moderna-en-paises-nordicos/), en la cual se insistía en que la escasa incidencia de estas complicaciones posvacunales y su generalmente buena evolución no motivaban ninguna modificación en las recomendaciones de vacunación. En el mismo sentido, la Nota de Seguridad emitida por la AEMPS en 9 de diciembre de 2021 confirma que «el balance beneficio/riesgo de Comirnaty y Spikevax se mantiene favorable, considerando la alta eficacia de estas vacunas en prevenir hospitalizaciones y muertes por COVID-19 y la baja frecuencia de aparición de estos cuadros, de curso generalmente benigno» (https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2021/docs/NI_MUH_FV-19-2021_miocarditis.pdf?x42382). En una revisión sistemática sobre efectos adversos de las vacunas de mRNA frente a la COVID-19, Oueijan *et al.* (2022) concluyen que los casos de miocarditis/pericarditis son raros y de pronóstico leve o moderado; la sintomatología incluye presión y dolor en el pecho (subesternal, medioesternal o retroesternal), palpitaciones intermitentes y disnea, junto con una elevación de marcadores como la troponina.

3.10.3. Otros efectos adversos

En su Nota de Seguridad de 11 de junio de 2021, la AEMPS se hace eco de seis casos de síndrome de fuga capilar sistémica (SFCS), en inglés «*systemic capillary leak syndrome*» (SCLS), documentados ante la EMA, que ocurrieron en personas tras su vacunación con Vaxzevria, de la que por aquellas fechas se habían administrado más de 78 millones de dosis en Reino Unido y el EEE; se resaltaba que tres de los seis pacientes (uno de las cuales falleció) tenían antecedentes de haber padecido este síndrome con anterioridad (https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/seguridad-1/2021-seguridad-1/vaxzevria-vacuna-frente-a-la-covid-19-de-astrazeneca-y-sindrome-de-fuga-capilar-sistemica/). En una Nota de Seguridad posterior (12 de julio de 2021), se informaban tres casos de SFCS tras vacunación con Jcovden, sobre unos 18 millones de personas inmunizadas con dicha vacuna (https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/seguridad-1/2021-seguridad-1/vacuna-frente-a-la-covid-19-de-janssen-y-riesgo-de-sindrome-de-fuga-capilar/). En ambos casos, se procedió a actualizar las fichas técnicas y prospectos de las dos vacunas y se recomendó contraindicar su administración en pacientes con antecedentes de SFCS.

El SFCS es un cuadro infrecuente, en el que la permeabilidad capilar anormalmente incrementada causa la extravasación de proteínas y líquido (es decir, de plasma), que fluye a los tejidos y cavidades vecinas, produciendo edema generalizado, hipotensión grave, hemoconcentración, hipoalbuminemia, disnea, etc., con riesgo de fallecimiento por shock cardiogénico. Aunque se han descrito casos de SFCS tras la administración de las vacunas de mRNA, su escasísima frecuencia no parece superior a la que ocurre en la población normal; es posible que el riesgo sea ligeramente mayor (pero en todo caso mínimo) para las vacunas de vector adenoviral (Park *et al.* 2022).

El síndrome de Guillain-Barré (SGB, o GBS de «*Guillain-Barré syndrome*») es una patología autoinmune que afecta a los nervios periféricos y que se manifiesta por sensaciones de hormigueo, dolor, entumecimiento, debilidad muscular y dificultad para caminar que puede llegar a la parálisis. El 18 de junio de 2021, la EMA emitió una actualización de seguridad sobre Vaxzevria, declarando la notificación de 156 casos de SGB tras inmunización con esta vacuna, sobre unos 40 millones de dosis administradas por entonces en la UE/EEE (https://www.ema.europa.eu/en/documents/covid-19-vaccine-safety-update/covid-19-vaccine-safety-update-vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-18-june-2021_en.pdf). Pocos días después (23 de julio) la AEMPS informaba de 108 casos de SGB tras vacunación con Jcovden, tres de ellos en España, donde se habían administrado cerca de 1,5 millones de dosis (https://www.aemps.gob.es/informa/notasinformativas/medicamentosusohumano-3/seguridad-1/2021-seguridad-1/vacuna-frente-a-la-covid-19-de-janssen-y-riesgo-de-sindrome-de-guillain-barre/).

En este y posteriores documentos, la AEMPS señala que, dada la posible relación entre las vacunas vectorizadas por adenovirus y el SGB, este será incluido en fichas técnicas y prospectos como una posible reacción adversa de frecuencia de aparición muy rara, que no se ha observado tras las vacunas de mRNA. Sin embargo, los datos recogidos por Angeli *et al.* (2023) no revelan ninguna asociación entre la vacunación con Vaxzevria o Jcovden y trastornos neurológicos como SGB, parálisis de Bell y encefalomielitis.

La hepatitis mediada por mecanismos inmunopatológicos es un posible efecto adverso de algunas vacunas, y también se han descrito casos tras la administración de vacunas de mRNA frente a la COVID-19: a título de ejemplo, el informe de 16 pacientes con daño hepático, de los cuales 12 habían sido vacunados con Comirnaty y cuatro con Spikevax, siendo de destacar que seis de ellos tenían antecedentes de enfermedad hepática crónica (Shroff *et al.* 2022). Se ha descrito la presencia de células T $CD8^+$ específicas de la proteína S en el hígado de un paciente con hepatitis tras vacunación con Comirnaty (Boettler *et al.* 2022).

Las crisis de hipertensión arterial se han señalado como otro efecto adverso de la vacunación frente a la COVID-19; el porcentaje de casos podría llegar a un 3,2 %, y al 0,6 % los que alcanzaron rango de emergencias hipertensivas (Angeli *et al.* 2022). Estas crisis suelen afectar a pacientes jóvenes (Angeli *et al.* 2023). Se ha especulado que la destrucción de células que expresan la proteína S liberaría un cantidad suficiente de esta proteína como para interaccionar con los receptores ACE2 de otras células, provocando su internalización y degradación y, en consecuencia, una menor inactivación de la angiotensina II, que finalmente llevaría al incremento de la presión arterial (Angeli *et al.* 2022).

También se han descrito varios casos de trastornos del ritmo cardíaco después de la administración de vacunas de mRNA; estas alteraciones incluyen contracciones ventriculares prematuras, taquicardia ventricular, bloqueo cardíaco y fibrilación ventricular (Angeli *et al.* 2023).

3.10.4. El problema de la posible retrotrotranscripción del mRNA

Como ya se comentó en la sección 1.4.7, una de las ventajas de las vacunas de mRNA respecto de las vacunas DNA o las vectorizadas por virus DNA es que el RNA no accede al núcleo celular y, por supuesto, no hay riesgos de inserción de material extraño en el genoma. Sin embargo, la existencia de retrotransposones activos en el genoma humano ha venido a desafiar este argumento.

Los transposones son secuencias de DNA que pueden cambiar de posición dentro de un genoma, produciendo mutaciones y alterando la expresión de otros genes. Los retrotransposones contienen el gen de una retrotranscriptasa que, si está activa, toma como molde el propio mRNA del retrotransposon para fabricar el DNA complementario, que puede integrarse en distintas localizaciones del DNA genómico (Burns y Boeke 2012): esta integración es una causa potencial de mutagénesis por inserción, reordenamientos cromosómicos e inestabilidad del genoma que contribuyen a diversas patologías, incluidas algunas formas de cáncer. LINE-1 (acrónimo de «*long interspersed element-1*») es el único retrotransposón autónomo existente en el genoma humano, del que ocupa un 17 % del genoma y siendo causa de variación genética interindividual e intraindividual; ya que estas variaciones pueden tener consecuencias patológicas, la expresión de LINE-1 en células normales está controlada por varios mecanismos (Liu *et al.* 2018).

Los primeros indicios del posible problema se plantearon en una publicación que describió, por una parte, que la infección de células humanas *in vitro* por los coronavirus coronavirus MERS-CoV, SARS-CoV y SARS-CoV-2 incrementó la expresión de retrotransposones como LINE-1; esto también se demostró analizando el transcriptoma de células de organoides intestinales humanos infectados con SARS-CoV-2; por otra parte, el examen de transcriptomas de células Calu-3 (una línea celular de carcinoma de pulmón humano) infectadas con SARS-CoV-2 identificaron transcritos quiméricos, consecuencia de la fusión de RNAs del virus con mRNAs de retrotransposones, especialmente de LINE-1 (Yin *et al.* 2021). Los autores concluían que la regulación positiva de retrotransposones inducida por la infección por coronavirus puede contribuir a la patología causada por estos virus.

Basándose en estos antecedentes y en un intento por explicar la persistencia de positividad en el diagnóstico por PCR en enfermos durante muchas semanas después del inicio de la infección por SARS-CoV-2 y en ausencia de evidencias de replicación del virus, Zhang *et al.* (2021a) infectaron células *in vitro* con SARS-CoV-2 y encontraron secuencias del virus fusionadas con secuencias del DNA celular, concluyendo que el RNA del SARS-CoV-2 puede transcribirse de forma inversa por LINE-1, integrarse en el genoma de la célula infectada y expresarse como transcripciones quiméricas en las que se fusionan secuencias virales con celulares. Adicionalmente, detectaron este tipo de transcritos quiméricos en tejidos derivados de pacientes de COVID-19 (Zhang *et al.* 2021a).

Estos hallazgos, publicados online a principios de mayo de 2021, causaron expectación en la comunidad científica, pero también fueron recibidos con cierta incredulidad, y en efecto pronto aparecieron respuestas

críticas. Una primera publicación, aparecida el 2 de junio de 2021, presentó datos que, aunque no descartaban de forma tajante la posible transcripción inversa y posterior integración de RNAs del SARS-CoV-2 en el DNA de células hospedadoras, sugieren que las lecturas quiméricas que se encuentran en los datos de secuenciación pueden surgir durante la preparación de la biblioteca y no significan necesariamente que el virus sea sujeto de transcripción inversa, integración en el ADN huésped y transcripción adicional; es decir, que es más probable que tales lecturas quiméricas sean un producto metodológico que el resultado de una auténtica transcripción inversa seguida de integración y expresión (Kazachenka y Kassiotis 2021). El 12 de julio, otra publicación incidía también en los aspectos metodológicos, señalando que la preparación de la biblioteca de secuencias de RNA es inherentemente propensa a errores debido al cambio aleatorio de plantilla durante la transcripción inversa de RNA a DNA complementario y mostrando, de hecho, que la frecuencia encontrada de lecturas quiméricas de RNA humano y RNA de SARS-CoV-2 estaba en el orden de magnitud del «ruido de fondo» obtenido a partir de una biblioteca de control de RNA humano al que se había añadido una pequeña cantidad de RNA de una especie no relacionada, como *Drosophila melanogaster*; la conclusión de este y otros experimentos fue que las detecciones de RNAs quiméricos por secuenciación de transcriptomas de células infectadas por SARS-CoV-3 reflejan en realidad acontecimientos extremadamente raros que probablemente son artefactos (Yan *et al.* 2021). En un artículo del 28 de julio se insiste en interferencia de artefactos que falsea la interpretación de los resultados de Zhang *et al.*, que de hecho no pudieron ser replicados (Smits *et al.* 2021). Recientemente, se ha señalado el cambio de plantilla, no durante la actuación de la transcriptasa inversa de LINE-1, sino de RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp) del propio SARS-CoV-2 como responsable de las lecturas quiméricas; curiosamente, los resultados de esta última publicación sugieren la posibilidad del proceso contrario: inserción de RNA humano en el genoma del virus; concretamente, se identificaron dos inserciones largas en genomas de variantes SARS-CoV-2 que probablemente derivan de RNA ribosomial humano (Yang *et al.* 2022).

Sin embargo, dando por buena la controvertida interpretación de Zhang *et al.* sobre la transcripción inversa de secuencias de RNA del SARS-CoV-2 y su integración en el genoma de la célula hospedadora, mediados por el retrotransposón LINE-1, y teniendo presente que los ensayos preclínicos mostraron efectos hepáticos reversibles en animales que recibieron la inyección de BNT162b2 (la actual Comirnaty), se realizó un estudio utilizando células Huh7 (una línea de carcinoma hepatocelular humano), cuyos resultados mostraron la entrada del mRNA vacunal en las células y su posterior retrotranscripción a DNA (Aldén *et al.* 2022). Aunque los autores no aportaron evidencias de integración en el genoma, si comentaron explícitamente la preocupante posibilidad de que tal integración ocurriese, lo que implicaría un riesgo de genotoxicidad que habría que añadir a los efectos potencialmente adversos de Comirnaty.

Obviamente, esta insistencia en la existencia de retrotranscripción de RNAs del SARS-CoV-2, extendida ahora a las vacunas de mRNA, ha generado respuestas de la comunidad científica. Las principales críticas, recogidas en la publicación de Merchant *et al.* (2022), pueden resumirse como sigue:

1. La línea Huh7 puede ser adecuada para estudiar la infección viral y la replicación *in vitro*, pero no refleja un entorno *in vivo*, sobre todo por la ausencia la ausencia de respuesta inmune; el modelo experimental empleado por Aldén *et al.* no es correcto para evaluar la genotoxicidad de las vacunas de mRNA *in vivo*, ya que la aparición en el hígado de hepatocitos expresando la proteína S los convertiría en blanco de una respuesta de anticuerpos y de células citotóxicas que los destruirían.
2. La dosis de vacuna utilizada *in vitro* es mucho mayor que la esperada *in vivo*.
3. El experimento de Aldén *et al.* empleó células Huh-7, de carcinoma hepatocelular, que difieren significativamente de los hepatocitos humanos primarios. Los propios autores reconocieron en su artículo que Huh-7 exhibe una replicación de ADN activa y una expresión de genes y proteínas significativamente diferente a la de los hepatocitos sanos; en particular, las proteínas implicadas en el metabolismo del RNA, reguladas al alza en las células Huh-7, pueden favorecer la transcripción inversa del mRNA transfectado *in vitro*, lo que no podría ocurrir en un hígado sano *in vivo*.

En conclusión, los datos que parecen demostrar la transcripción inversa de la vacuna BNT162b2 de mRNA en células de carcinoma hepatocelular *in vitro*, no pueden extrapolarse a situaciones *in vivo* y, por tanto, no puede generalizarse a la población sana que recibe esta u otras vacunas de mRNA frente a la COVID-19 (Merchant *et al.* 2022).

3.11. Perspectivas de las vacunas frente a COVID-19

3.11.1. El panorama actual

Según la información ofrecida por el proyecto «Our World in Data», en el que colaboran investigadores de

la Universidad de Oxford (Programa Oxford Martin sobre Desarrollo Global) y la organización sin fines de lucro Global Change Data Lab, a 22 de noviembre de 2023 se habían administrado en todo el mundo alrededor de 13,53 miles de millones de dosis de vacunas frente a la COVID-19, calculándose que el 70,6 % de la población mundial había recibido al menos una dosis, si bien este porcentaje desciende al 32,8 % en países con bajos ingresos (https://ourworldindata.org/covid-vaccinations). En España, los datos presentados por el Gobierno a través de su «Información oficial sobre la vacunación contra el nuevo coronavirus» (Estrategia de vacunación COVID-19) actualizados a 30 de junio de 2023 indican que, sobre una población estimada de 48,34 millones de habitantes, 41,35 millones (o que representa un 85,5 %) habían recibido al menos una dosis y 40,74 (84,3 %) la pauta completa (https://www.vacunacovid.gob.es/). Por tanto, se dispone de información suficiente para contrastar las cualidades demostradas por las vacunas en los ensayos clínicos con los que se ha denominado su «comportamiento en el mundo real», establecido a partir de los seguimientos de farmacovigilancia. La OMS ha adoptado la diferenciación entre los términos «eficacia» y «efectividad» de las vacunas, entendiendo por eficacia el comportamiento en ensayos clínicos controlados (comparando el número de casos positivos para COVID-19 en el grupo vacunado y el grupo placebo) y por efectividad el comportamiento en el mundo real (el grado de protección que la vacunación confirió a las personas frente a la infección, enfermedad sintomática, hospitalización y muerte, generalmente medido en estudios observacionales); ambas evaluaciones pueden ser diferentes, ya que no es posible predecir con precisión la efectividad de la vacunación en las poblaciones más grandes y variables del mundo real (Liu *et al.* 2022b).

Con esta perspectiva, se puede afirmar que todas las vacunas utilizadas contra la COVID-19 tuvieron una alta efectividad contra la cepa original de SARS-CoV-2 y retuvieron su efectividad, aunque con progresiva disminución, frente las variantes que han ido surgiendo; además, todas ellas fueron bien toleradas, pudiendo afirmarse que los efectos adversos graves informados fueron muy raros y que los beneficios de la vacunación contra el COVID-19 superaron con creces los riesgos potenciales (Fiolet *et al.* 2022). Una revisión comparativa de las vacunas de más amplia utilización (las vacunas de mRNA Spikevax y Corminarty; de vector adenoviral Vaxzevria, Jcovden y Sputnik-V; inactivadas CoronaVac, BBIBP-CorV y Covaxin; y subunidad Nuvaxovid y SCB-2019) mostró que todas ellas eran efectivas, pero las vacunas de mRNA parecieron superiores para prevenir la COVID-19 sintomática, aunque las vectorizadas por adenovirus fueron algo más efectivas en la reducción de la mortalidad (Korang *et al.* 2022). Los resultados de efectividad de las dos vacunas de mRNA fueron muy parecidos, lo que concuerda con la semejanza de ambas, que solo difieren en aspectos puntuales de sus formulaciones de nanopartículas; por el contrario, fueron bastante heterogéneos al comparar las tres vacunas de vector adenoviral, tal vez debido a que utilizan distintos adenovirus (Korang *et al.* 2022). Según Krammer (2023), las vacunas de mRNA y las de proteínas recombinantes han sido las más efectivas, seguidas de las vacunas vectorizadas, por delante de las vacunas de virus inactivados.

En España, el informe de diciembre de 2022 del Ministerio de Sanidad sobre el seguimiento de la efectividad de la vacunación frente a hospitalización y fallecimiento por COVID-19 analizando el período de abril de 2021 a diciembre de 2022 mostró un elevado porcentaje de protección, en especial después de la tercera dosis (primera de refuerzo), aunque durante la primera mitad de 2022 las tasas de efectividad disminuyeron sensiblemente debido a la expansión de la variante Ómicron y su capacidad de escape a la inmunidad previa frente a la cepa original del virus (https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/Informes%20COVID-19/Otros_Informes_COVID-19/Informes_Periodicos_Seguimiento_Vacunaci%C3%B3n_COVID-19/Informe%20vacunas_CNE_2212_Diciembre.pdf).

¿Cuáles son los retos que la vacunación frente a la COVID-19 plantea en la actualidad? En su revisión sobre el comportamiento de estas vacunas en el mundo real, Liu *et al.* (2022b) mencionan los siguientes: es necesario establecer un estándar de evaluación unificado (universal) de la eficiencia y seguridad de las vacunas; investigar la duración de la inmunidad protectora tras la vacunación y establecer los calendarios óptimos para las dosis de refuerzo; resolver la asignación y distribución rápida y efectiva de las vacunas aprobadas a los países de ingresos bajos y medianos; y, ante la aparición de nuevas variantes de SARS-CoV-2 que pueden escapar, aunque sea parcialmente, a la inmunidad de las vacunaciones previas, desarrollar y fabricar vacunas de nueva generación que protejan satisfactoriamente frente a dichas variantes emergentes.

3.11.2. Duración de la inmunidad

Ciertamente, las respuestas a estos retos cuentan ya con bases experimentales. En lo que se refiere a la duración de la inmunidad protectora, hay datos contrastados que revelan una disminución de la protección contra la infección sintomática a partir de las 10 semanas posteriores a la recepción de la segunda dosis de Corminarty o de Vaxzevria; sin embargo, la protección contra

la hospitalización y la muerte se mantuvo en niveles altos durante al menos 20 semanas después de recibir dicha segunda dosis (Andrews *et al.* 2022). En términos generales, se acepta que la inmunidad tras la pauta completa de las vacunas que se están utilizando frente a la COVID-19 parece durar al menos entre seis y nueve meses (Tartof *et al.* 2021; Liu *et al.* 2022b). Obviamente, una tercera dosis de vacuna mejora la inmunidad tanto humoral como celular contra el SARS-CoV-2, con una mayor actividad neutralizante contra diferentes variantes (Andrews *et al.* 2022; Tartof *et al.* 2022); es necesario investigar los intervalos óptimos entre dosis, que podrían ser mayores de los aconsejados inicialmente (Andrews *et al.* 2022).

3.11.3. Distribución equitativa de las vacunas

La accesibilidad a las vacunas en los países en desarrollo es, ante todo, una exigencia ética, pero también tiene una base pragmática: como acertadamente señala la OMS, «cuando una pandemia avanza rápidamente, nadie estará salvo a menos que todo el mundo lo esté»; y esto es especialmente cierto en el caso de una pandemia causada por un virus con capacidad para mutar y generar variantes mientras persistan focos de infección.

Las organizaciones GAVI, The Vaccine Alliance (GAVI es el acrónimo de «*Global Alliance for Vaccines and Immunization*»), CEPI («*Coalition for Epidemic Preparedness Innovations*») y la propia OMS coordinan COVAX («*COVID-19 Vaccines Global Access*»), un programa internacional diseñado para satisfacer las demandas de vacunación en países en desarrollo, impulsando la asignación equitativa de dosis de vacunas frente a la COVID-19 financiadas por donantes. COVAX, creado en abril de 2020, busca garantizar que las vacunas se desarrollen lo más rápidamente posible, que se fabriquen en los volúmenes adecuados sin mermas en materia de seguridad y que se hagan llegar a quienes más las necesitan (https://www.who.int/es/initiatives/act-accelerator/covax). COVAX ha establecido mecanismos para conseguir un acceso justo y equitativo a las vacunas frente a la COVID-19, incluyendo un instrumento de financiación destinado a facilitar la adquisición de vacunas eficaces y seguras a los países de ingresos medianos y bajos (Hotez *et al.* 2021). Sin embargo, es imprescindible que los propios sistemas de salud de los países afronten sus responsabilidades; aunque, ciertamente, con la ayuda internacional, que por ejemplo debiera contribuir al sostenimiento de la fabricación autóctona de vacunas, evitando así que las empresas indias Bharat Biotech y Serum Institute hayan tenido que detener la producción de las vacunas Covaxin y Covovax, respectivamente (Privor-Dumm *et al.* 2023).

Con fecha 12 de julio de 2022, la OMS publicó un comunicado de prensa que recoge la «Duodécima reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional sobre la pandemia de enfermedad por coronavirus (COVID-19)», manifestando que Los Estados Parte deberían alcanzar la máxima cobertura de vacunación posible entre las personas con mayor riesgo de desenlaces graves y entre las personas con mayor riesgo de exposición, los trabajadores de la salud, las personas mayores y otros grupos prioritarios; y una cobertura de al menos el 70 % en la población general. Esta cobertura incluye la administración de una pauta de primovacunación (generalmente de dos dosis) y las posteriores dosis de refuerzo. Se destacaba que los Estados Parte con menos de un 20 % de cobertura de vacunación deberían elaborar estrategias y/o recibir asistencia para mejorar su situación (https://www.who.int/es/news/item/12-07-2022-statement-on-the-twelfth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic). Ya en este comunicado se sugería la posibilidad de integrar la vacunación contra la COVID-19 en los servicios de vacunación sistemática, poniendo como ejemplo la administración simultánea de la vacuna contra la COVID-19 y una vacuna inactivada contra la gripe estacional.

3.11.4. Variantes del SARS-CoV-2 y escape de la inmunidad previa

La incapacidad de las RNA-polimerasas para corregir los errores de incorporación de nucleótidos es la causa de las altas tasas de mutación de los virus con genoma RNA. Pero el genoma de los coronavirus contiene un gen que codifica para la proteína Nsp-14, cuyo dominio amino-terminal ExonN posee actividad exonucleasa que actúa sobre la cadena naciente de RNA cortando los nucleótidos incorporados erróneamente, lo que reduce considerablemente la tasa de mutaciones en estos virus (ver el capítulo XV de este libro). Sin embargo, la expansión pandémica del SARS-CoV-2 ha causado un altísimo ritmo de replicación, propiciando la acumulación de mutaciones; la presión selectiva ha tenido como resultado la emergencia de sucesivas variantes del virus que originó el brote inicial en Wuhan. Plante *et al.* (2021) han propuesto tres grupos de mutaciones que serán seleccionadas positivamente: las que causan mejoras en la capacidad intrínseca de replicación o de transmisión del virus; las que afectan a interacciones con proteínas del hospedador (se han descrito interacciones con más de 300 proteínas), incluyendo las implicadas en control de la maquinaria de traducción, en el tráfico de membranas y vesículas intracelulares, y en la regulación epigenética, algunas de las cuales pueden interferir con mecanismos

de inmunidad innata; y las que causan cambios antigénicos que promueven el escape a las respuestas de inmunidad específica. Al inicio de la pandemia la mayor parte de la población carecía de inmunidad específica frente al virus, por lo que los cambios antigénicos no reportaban ventajas significativas; los mutantes seleccionados fueron aquellos que adquirieron mejoras en las tasas de replicación y de trasmisión; conforme se fue incrementando la proporción de individuos inmunizados, al principio por haber pasado ya la infección y posteriormente por la introducción de las vacunas, los cambios antigénicos ganaron peso al favorecer el escape de los mutantes y su capacidad tanto para reinfectar como para propagarse en la población vacunada (Carabelli *et al.* 2023).

Como ocurre con otros virus RNA, los equilibrios entre las mutaciones y las presiones selectivas han generado enjambres de mutantes o cuasiespecies (Singh *et al.* 2023), tipificadas por variantes que acumulan diversas mutaciones cuyo balance es favorable al virus, lo que obviamente aumenta los riesgos para la salud pública por los posibles incrementos en morbilidad y/o gravedad de la enfermedad (Saksena *et al.* 2023). Por ello, la OMS focalizó su atención en el impacto de las sucesivas variantes, creando en junio de 2020 el Grupo de Trabajo sobre Evolución del Grupo (*WHO Virus Evolution Working Group*), que posteriormente pasó a ser el Grupo Asesor Técnico sobre la Evolución del Virus SARS-CoV-2 (*Technical Advisory Group on SARS-CoV-2 Virus Evolution*). De acuerdo con la nomenclatura adoptada por la OMS, las principales variantes reconocidas han sido las que se enumeran a continuación, junto con sus lugares de origen y las fechas de las muestras más antiguas (aunque en algunos casos la variante haya sido caracterizada con posterioridad):

— Alfa: UK, septiembre de 2020.
— Beta: Sudáfrica, octubre de 2020.
— Gamma: Brasil, noviembre de 2020.
— Delta: India, octubre de 2020.
— Épsilon: EEUU, marzo de 2020.
— Zeta: Brasil, abril de 2020.
— Eta: Varios países, diciembre de 2020.
— Theta: Filipinas, enero de 2021.
— Iota: EEUU, noviembre de 2020.
— Kappa: India, octubre de 2020.
— Lambda: Perú, diciembre de 2020.
— Mu: Colombia, enero de 2021.
— Ómicron: Sudáfrica, noviembre de 2021.

Las variantes dominantes no evolucionaron unas a partir de otras, sino que se originaron a partir de progenitores anteriores y se han ido sustituyendo sucesivamente hasta la emergencia de Ómicron, que se ha convertido en el origen de una serie de cinco linajes principales (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5), los cuales a su vez están generando sub-linajes (como BA.2.75) (Carabelli *et al.* 2023). Además de las mutaciones, la recombinación de genomas de virus distintos es otra fuente de diversidad. Las recombinaciones pueden ocurrir cuando dos linajes genéticamente distintos coinfectan una misma célula; así, durante el solapamiento que ocurrió cuando Ómicron desplazó a Delta surgió un recombinante de Delta AY.4 y Ómicron BA.1, al que se denominó Deltacrón (también designado como XD), cuya proteína S acumula mutaciones de ambos progenitores (Fang *et al.* 2023). Asimismo están apareciendo recombinantes entre sub-linajes de Ómicron: es el caso de XBB, resultante de una recombinación de BA.2.10.1.1 y BA.2.75 (Carabelli *et al.* 2023). Estos sub-linajes de Ómicron y sus recombinantes son los responsables de las oleadas actuales.

En la fecha en se escribe este texto Ómicron es la variante dominante a nivel mundial (Saksena *et al.* 2023). Si en su actualización semanal del 30 de noviembre de 2021 la OMS comunicaba de menos del 0,1 % de las secuencias enviadas a GISAID pertenecían a Ómicron, en la de 25 de enero de 2022 el porcentaje ya se había elevado al 98,8. El gran número de mutaciones acumuladas en esta variante se ha reflejado en un fenotipo modificado de entrada en las células y en importantes cambios antigénicos (Carabelli *et al.* 2023). En la sección 3.2.2 del capítulo XV se explica que el SARS-CoV-2, una vez que se ha unido a su receptor ACE2, puede utilizar dos vías para entrar en las células, según que la envoltura del virión se fusione con la membrana citoplásmica, lo que ocurre al pH neutro extracelular y requiere la acción de la proteasa TMPRSS2, o con membranas endosomiales previa endocitosis, en cuyo caso las proteasas que actúan son las catepsinas B y L. Mientras que el virus original y sus variantes anteriores a Ómicron utilizan preferentemente la vía mediada por TMPRSS2, Ómicron entra de forma más eficiente por la vía endosomial dependiente de las catepsinas; pero las células del tracto respiratorio superior (mucosas nasal y faríngea) expresan deficientemente TMPRSS2, a diferencia de la mucosa del tracto respiratorio inferior, lo que determina un sesgo hacia la infección del tracto superior (Carabelli *et al.* 2023; Fang *et al.* 2023). Esto se traduce en mayores tasas de contagio (al verse favorecida la trasmisión desde las secreciones nasales y gotitas de saliva), pero también en una patogenia menos grave, por la menor afectación pulmonar y la capacidad disminuida del virus para fusionar células y formar sincitios (Gong *et al.* 2022; Zhao *et al.* 2022; Carabelli *et al.* 2023; Fang *et al.* 2023).

En cuanto a los cambios antigénicos, son tan notables que algunos autores han propuesto incluir al complejo formado por los linajes y sub-linajes Ómicron en un nuevo serotipo, distinto de los anteriores linajes

(Carabelli *et al.* 2023). Se observó que los sueros de convalecientes que en su momento se infectaron con la cepa ancestral de Wuhan, y que seguían siendo capaces de neutralizar, aunque en menor medida, a sucesivas variantes, mostraron una considerable reducción de su eficiencia en neutralizar a Ómicron (Liu *et al.* 2022a; Ma *et al.* 2022). En consecuencia, la inmunidad frente a las anteriores variantes pierde mucha eficacia frente a Ómicron, que infecta a personas que cumplieron pautas completas de inmunización con vacunas de la primera generación, así como a personas que padecieron COVID-19 antes de la vacunación; si bien es cierto que esa inmunidad previa sigue confiriendo protección frente a las manifestaciones más graves de la infección por Ómicron y reduce significativamente las tasas de hospitalización y mortalidad (Liu *et al.* 2022b; Martin Sánchez *et al.* 2023). Las dosis de refuerzo con vacunas de mRNA elevan al 70 % la protección frente a la hospitalización por causa de infecciones con Ómicron (Nyberg *et al.* 2022).

Otro aspecto para considerar es el papel, a menudo olvidado, de la inmunidad celular en la protección frente al SARS-CoV-2. Se ha descrito que la protección producida por vacunas de mRNA comienza cuanto aparecen células T efectoras, aunque los anticuerpos neutralizantes todavía son indetectables (Kalimuddin *et al.* 2021). En el proteoma del SARS-CoV-2 se han definido epítopos reconocibles por células T $CD8^+$, restringidos a las mutaciones, es decir, conservados entre las distintas variantes, lo que podría tomarse como base para futuras vacunas de amplio espectro (Nathan *et al.* 2021). Mientras que las respuestas de anticuerpos neutralizantes y de células B de memoria inducidas por las vacunas se redujeron significativamente frente a las variantes de SARS-CoV-2 y, en especial, frente a Ómicron (reducción al 42 %), las respuestas de células T de memoria, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$, se conservaron por encima del 80 % para Ómicron, con un promedio de al menos 10 epítopos reconocidos en la proteína S por estas células (Tarke *et al.* 2022). Estos y otros resultados confirman que, frente a la reducción de actividad de los anticuerpos neutralizantes, las respuestas de células T inducidas por la vacuna mantienen una potente reactividad cruzada contra las distintas variantes del SARS-CoV-2, incluyendo Ómicron (que es, por ahora, la más efectiva en la evasión de la inmunidad previa), lo que explica la protección que siguen ofreciendo las vacunas actuales y ofrece una base para el diseño de vacunas futuras (Chiuppesi *et al.* 2022; Carabelli *et al.* 2023).

Para evaluar los riesgos potenciales planteados por la aparición de sucesivas variantes del SARS-CoV-2, la OMS estableció una serie de categorías: variantes bajo seguimiento («*variants under monitoring*», VUM), variantes de interés («*variants of interest*», VOI) y variantes de preocupación («*variants of concern*», VOC), cuyas definiciones actualizadas (WHO, *Updated working definitions and primary actions for SARS-CoV-2 variants, 4 October 2023*, https://www.who.int/publications/m/item/updated-working-definitions-and-primary-actions-for--sars-cov-2-variants) se resumen a continuación:

— Variante bajo seguimiento (VUM): Una variante del SARS-CoV-2 con cambios genéticos que se sospecha que afectan las características del virus manifestando señales tempranas de ventaja en el crecimiento en relación con otras variantes circulantes, pero para la cual la evidencia del impacto epidemiológico sigue sin estar clara, lo que requiere un mayor seguimiento y reevaluación en espera de nueva evidencia.
— Variante de interés (VOI): Una variante del SARS-CoV-2 con cambios genéticos de los que se predice o se sabe que afectan las características del virus, como la transmisibilidad, la virulencia, la evasión de anticuerpos, la susceptibilidad a la terapéutica y la detectabilidad; y se ha identificado que tiene una ventaja de crecimiento sobre otras variantes circulantes en más de una región de la OMS con una prevalencia relativa creciente junto con un número creciente de casos a lo largo del tiempo, u otros impactos epidemiológicos aparentes que sugieren un riesgo emergente para la salud pública mundial.
— Variante preocupante (VOC): Una variante del SARS-CoV-2 que cumple con la definición de VOI y que cumple con al menos uno de los siguientes criterios en comparación con otras variantes: Cambio perjudicial en la gravedad de la enfermedad clínica; o cambio en la epidemiología de la COVID-19 que causa un impacto sustancial en la capacidad de los sistemas de salud para brindar atención a pacientes con COVID-19 u otras enfermedades y, por lo tanto, requiere importantes intervenciones de salud pública; o disminución significativa de la eficacia de las vacunas disponibles para proteger contra enfermedades graves.

En la actualización de noviembre de 2023 (WHO, *Tracking SARS-CoV-2 variants*, https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/), la categoría de VUM incluye cinco sub-linajes y recombinantes derivados de Ómicron (DV.7, XBB excepto sub-linajes señalados como VOI, XBB1.9.1, XBB.1.9.2 excepto sub-linajes señalados como VOI y XBB.2.3); la categoría de VOI contiene cuatro (XBB.1.5, XBB.1.16, EG.5 y BA.2.86); y no hay ninguna variante en la categoría de VOC (a la que en su momento pertenecieron las variantes Alfa y Beta, reconocidas como VOC desde diciembre de 2020 hasta de marzo de 2022; Gamma, desde enero de 2021 hasta marzo de 2022; Delta, desde mayo de 2021 hasta de

2022; y Ómicron desde noviembre de 2021 hasta marzo de 2023). Los criterios de categorización de la OMS coinciden mayoritariamente con los del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) (https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/variants-concern) y de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html), si bien los CDC añaden una cuarta categoría, designada como variantes de gran relevancia («*variant of high consequence*», VOHC), para las posibles variantes con evidencias claras de enfermedad más grave, escasa susceptibilidad a los tratamientos aprobados, escape efectivo a la protección conferida por las vacunas (alta proporción de infecciones y hospitalizaciones en individuos vacunados), o fallo en los procedimientos de diagnóstico de laboratorio; hasta el momento, ninguna de las variantes conocidas se ha incluido en este grupo.

3.11.5. Composición de las nuevas vacunas y vacuna pancoronavirus

Una opinión compartida por muchos científicos es que, a pesar de los esfuerzos por combatirlo, el SARS-CoV-2 no será erradicado, sino que evolucionará generando nuevas variantes, de las que aquellas con transmisibilidad mejorada y mayor capacidad para evadir las respuestas inmunitarias producirán nuevas oleadas de infecciones, aunque, por otra parte, es de esperar que la poblaciones, a través de una combinación de infección y vacunación, lograrán alcanzar un cierto grado de equilibrio inmunológico con el virus (Ertl *et al.* 2022). Obviamente, este futuro requiere el desarrollo de vacunas que mantengan o incrementen la eficiencia frente a las formas graves de COVID-19, y que, a ser posible, protejan también de la infección.

En un comunicado de prensa de 11 de enero de 2022 (Declaración provisional sobre las vacunas contra la COVID-19, en el contexto de la circulación de la variante ómicron del SARS-CoV-2, del Grupo Consultivo Técnico de la OMS sobre la Composición de las Vacunas contra la COVID-19), la OMS planteó la posibilidad de cambios en la composición de las vacunas, basándose en los siguientes requisitos:

— Las vacunas deben basarse en cepas que sean genética y antigénicamente parecidas a la(s) variante(s) circulante(s) del SARS-CoV-2.
— Además de ofrecer protección contra la muerte y las formas graves de enfermedad, las vacunas deben proteger más eficazmente de la infección, reduciendo así la transmisión comunitaria y, con ello, la necesidad de medidas sociales y de salud pública estrictas y generalizadas.
— Las vacunas deben provocar una respuesta inmunitaria amplia, vigorosa y duradera para reducir la necesidad de sucesivas dosis de refuerzo.

En ese mismo documento, la OMS proponía tres estrategias. Por una parte, el desarrollo de nuevas vacunas monovalentes dirigidas frente a las nuevas variantes; la dificultad de esta opción es que las variantes aparecen y, en algunos casos, se extienden con gran rapidez, con lo que las nuevas vacunas *ad hoc* llegarán con un cierto retraso. La segunda opción es desarrollar vacunas polivalentes que contengan antígenos de distintas variantes preocupantes del SARS-CoV-2, con lo que la probabilidad de proteger frente a variantes nuevas por reacciones cruzadas es también mayor. La tercera sería conseguir una vacuna universal, efectiva frente a todas las variantes del SARS-CoV-2 (https://www.who.int/es/news/item/11-01-2022-interim-statement-on-covid-19-vaccines-in-the-context-of-the-circulation-of-the-omicron-sars-cov-2-variant-from-the-who-technical-advisory-group-on-covid-19-vaccine-composition).

Posteriormente (Declaración provisional sobre la composición de las vacunas anticovídicas actuales, de 17 de junio de 2022), la OMS insistió en que una dosis de refuerzo de las vacunas actualmente autorizadas frente a la COVID-19, que están basadas en el virus inicial de Wuhan, podía restablecer la protección contra la enfermedad grave y la muerte en las infecciones causadas por las variantes actualmente en circulación (incluyendo a Ómicron) a niveles que siguen siendo suficientemente altos; pero se reconocía que sería aconsejable modificar la composición de las vacunas a fin de ampliar la protección inmunitaria contra las variantes circulantes y emergentes. Una conclusión importante del documento fue que la inclusión de Ómicron en una dosis de refuerzo sería beneficiosa para poblaciones primovacunadas contra la COVID-19; pero se desaconsejó el uso de una vacuna monovalente basada únicamente en Ómicron para la primovacunación, por el temor de que no produjesen niveles suficientes de inmunidad cruzada y protección contra la enfermedad grave causada por otras variantes en individuos sin inmunización previa, cosa que si ofrecen las vacunas creadas a partir del virus inicial (https://www.who.int/es/news/item/17-06-2022-interim-statement-on--the-composition-of-current-COVID-19-vaccines). El 18 de mayo de 2023, la OMS emitió una «Declaración sobre la composición antigénica de las vacunas COVID-19», indicando que las nuevas formulaciones de vacunas frente a la COVID-19 deberían tener como objetivo inducir respuestas de anticuerpos que neutralicen los sub-linajes de Ómicron descendientes de XBB y más concretamente de XBB.1, por ser los dominantes a nivel mundial (https://www.who.int/news/

item/18-05-2023-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines).

En consecuencia, los fabricantes pasaron a la elaboración de vacunas de segunda generación, como refuerzos monovalentes o bivalentes conteniendo especificidades de Ómicron (Angeli *et al.* 2023; Carabelli *et al.* 2023). Las agencias reguladoras siguen exigiendo estudios para evaluar la seguridad de estas nuevas vacunas y, en virtud de ello, tanto la FDA como la EMA autorizaron vacunas bivalentes de mRNA frente al virus original de Wuhan y un linaje Ómicron. En septiembre de 2022 la EMA autorizó las vacunas Comirnaty Original/Omicron BA.1 y Spikevax Original/Omicron BA.1. A principios de diciembre de 2023, la EMA contempla, además de las dos anteriores, las siguientes vacunas con componentes de Ómicron: Comirnaty Original/BA.4-5, Comirnaty monovalente XBB.1.5, Spikevax Original/BA.4-5, Spikevax monovalente XBB.1.5 y Nuvaxovid monovalente XBB.1.5 (https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/covid-19-medicines#covid-19-vaccines:-strains,-use-and-age-ranges-section).

Es razonable suponer que en un futuro próximo estas exigencias se rebajarán para conseguir una mayor agilidad de respuesta ante nuevas variantes, de una manera similar al modelo actual de vacunas anuales frente a la gripe (Martín-Sánchez *et al.* 2023). De hecho, en España, la vacunación frente a gripe ha coincidido, desde la temporada 2021-2022, con la vacunación frente a COVID-19, y en la campaña 2023-2024 se han introducido las vacunas Comirnaty original/BA.4-5, Spikevax original/BA.1, Spikevax original/BA.4-5 y la monovalente Comirnaty XBB.1.5 (además de Bimervax, cuya versión en estas fechas no contiene antígeno de Ómicron, pero que usada como dosis de refuerzo proporciona cierto nivel de protección frente a esta variante, como se ha señalado en la sección 3.6) (https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/gripe_covid19/docs/RecomendacionesVacunacion_Gripe-Covid19.pdf).

La solución definitiva para prevenir con éxito las posibles oleadas de infección debidas a futuras variantes de SARS-CoV-2 la aportaría el desarrollo de vacunas eficaces frente a todos los miembros del género *Betacoronovirus* (lo que incluiría al MRS-CoV) o, al menos, frente a los del subgénero *Sarbecovirus* (donde, dentro de una única especie, figuran SARS-CoV y SARS-CoV-2, así como numerosos coronavirus aislados de murciélagos, civetas, pangolín); para designar a estas futuras vacunas, actualmente en investigación, se emplea el término de «vacunas pancoronavirus», aunque no se trataría propiamente de vacunas «universales» para todos los coronavirus (lo que no parece posible conseguir), sino de vacunas capaces de conferir protección suficiente frente a los grandes patógenos humanos del género o del subgénero y, por ende, frente a las variantes emergentes (Dolgin 2022). Para ello, se pueden seguir dos estrategias: una consiste en buscar epítopos que induzcan anticuerpos neutralizantes y que no se vean afectados por mutaciones, es decir, que estén muy conservados en los distintos sarbecovirus; la otra, en elaborar «vacunas mosaicos», que incluyan una diversidad de epítopos de forma que sea altamente probable que entre los diversos anticuerpos inducidos, algunos reconozcan los epítopos modificados por mutaciones de las variantes emergentes.

La búsqueda de epítopos conservados para el diseño de vacunas tiene una base en el hallazgo de anticuerpos monoclonales con amplio espectro de neutralización dirigidos con determinados epítopos del RBD que se conservan en variantes de SARS-CoV-2 como Ómicron y en otros sarbecovirus (Purcell *et al.* 2022). Uno de estos es el anticuerpo humano 76E1, aislado de un convaleciente de COVID-19, que neutraliza a las variantes Alfa, Beta, Gamma, Kappa, Delta y Ómicron del SARS-CoV-2 y a otros coronavirus, incluyendo el betacoronavirus HCoV-OC43 del subgénero *Embecovirus*; este anticuerpo reconoce un epítopo que está parcialmente enterrado en la estructura del trímero de la proteína S del SARS-CoV-2 en el estado de prefusión, pero que se expone cuando la proteína se une a su receptor ACE2, y que podría ser un epítopo crucial para el diseño de vacunas pancoronavirus (Sun *et al.* 2022). Otro anticuerpo humano, designado como DH1047, protege al ratón de la infección con variantes de SARS-CoV-2 y con otros sarbecovirus, habiéndose demostrado que se une con alta afinidad a un epítopo del RBD que está altamente conservado entre los sarbecovirus (Martinez *et al.* 2022). Este epítopo está presente en una vacuna multimérica de RBD conjugada a ferritina en forma de nanopartículas asociadas a un adyuvante de alumbre con el agonista de TLR7 y TLR8 3M-052, que se considera capaz de inducir respuestas de anticuerpos similares a DH1047 y podría ser modelo de futuras vacunas pan-sarbecovirus, potencialmente capaces de proteger frente a la futura aparición de virus relacionados con el SARS-CoV o el SARS-CoV-2 (Saunders *et al.* 2021).

En cuanto a la estrategia de las vacunas en mosaico, se ha propuesto el uso de modelos inmunoinformáticos para diseñar vacunas multiepítopo, basadas en regiones conservadas de la proteína S para diversos betacoronavirus; de esta manera se ha diseñado una vacuna que contiene tanto epítopos para células B como para células T (curiosamente, estos últimos están ubicados mayoritariamente en S2) y que se espera sea efectiva frente a las variantes actuales y futuras del SARS-CoV-2 y de otros posibles coronavirus emergentes relacionados con él (Baloch *et al.* 2022).

Aunque la proteína S y, en concreto, su RBD, se han constituido como la base de la mayoría de las vacunas frente al SARS-CoV-2, debería considerarse si la inclusión de proteínas adicionales más conservadas puede, a través de las células T $CD8^+$, aumentar la amplitud y la duración de la protección vacunal; y si la adaptación de vacunas a la administración mucosal resultaría en una inmunidad más efectiva (Ertl *et al.* 2022). Aunque no impidiesen la infección, las vacunas capaces de proporcionar protección cruzada basada en células T podrían proporcionar una protección sustancial contra las formas graves de la COVID-19 (Krammer 2023).

3.11.6. Lecciones para el futuro

Sin duda, la pandemia causada por el SARS-CoV-2 ha constituido la mayor amenaza a la salud pública que se ha conocido desde la pandemia de gripe que se extendió de 1918 a 1919 (Fauci y Folkers 2023). La edición 161 del *COVID-19 Epidemiological Update* que confecciona la OMS, publicada el 24 de noviembre de 2023, reporta una estimación de 772.166.517 de casos confirmados de COVID-19 desde el inicio de la pandemia, con 6.987.831 de fallecimientos (https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update---24-november-2023), aunque probablemente estas cifras están subestimadas. La otra gran pandemia iniciada en el pasado siglo, causada por el lentivirus HIV-1, se calcula que ha afectado desde su inicio a 85,6 millones de personas, una cifra sensiblemente inferior; y aunque la mortalidad del SIDA es muy superior (se estima que han podido fallecer más de 40 millones) y en los primeros años causó una gran alarma social (hasta el advenimiento de los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia), hay que tener presente que las cifras mencionadas se distribuyen durante un largo período de 43 años y que en ningún momento han causado el impacto social y económico que ha tenido la COVID-19. La pandemia del SARS-CoV-2 ha ejercido durante más de tres años una presión tremenda, a veces no superada, en los servicios de salud a nivel mundial; algunas secuelas, como la acumulación de pacientes de otras muy diversas patologías que fueron desatendidos, no tratados e incluso no diagnosticados, aún persisten (Owen *et al.* 2023).

¿Pudo haberse previsto este desastre, se podrían haber adoptado medidas y estrategias para aminorar su impacto? En opinión de expertos, los gobiernos y las organizaciones de salud ignoraron durante años advertencias que predecían la amenaza de pandemias con graves repercusiones en la salud pública (Owen *et al.* 2023). Basta recordar las alarmas debidas a la gripe aviar, con el riesgo latente de mutaciones que adaptasen cepas aviares, muy virulentas, al hospedador humano; y a los brotes de SARS-CoV y MERS-CoV, que fueron correctamente interpretados por Graham *et al.* (2013) como avisos de una muy probable irrupción de nuevas infecciones humanas emergentes por coronavirus. Adicionalmente, una vez reconocido, el 30 de enero de 2020, que un nuevo coronavirus estaba causando un brote mundial calificado como emergencia de salud pública de importancia internacional, no se adoptó una actitud de contención suficientemente agresiva como para poder contener la pandemia (Owen *et al.* 2023).

Fauci y Folkers (2023) han propuesto hasta una decena de lecciones que ha ofrecido la pandemia de COVID-19; a efectos de este capítulo, tiene especial interés la quinta lección, que los propios autores consideran la de mayor importancia: las inversiones sostenidas en apoyo de la investigación, tanto básica como clínica, son esenciales para que, en presencia del desafío de una pandemia, se pueda responder con contramedidas eficaces y rápidas. Como ejemplo ilustrativo de esta lección señalan la investigación básica que llevó a desarrollar la plataforma de vacunas de mRNA: esto hizo posible disponer de vacunas eficaces frente a la COVID-19 en un plazo asombrosamente corto (menos de 11 meses). La *Coalition for Epidemic Preparedness Innovations* (CEPI), creada en 2016 tras el gran brote de Ébola en África Occidental, se ha propuesto como objetivo acortar aún más el proceso de desarrollo de una vacuna contra la una posible próxima pandemia, reduciéndolo a solo 100 días (Usher 2022).

En los tiempos actuales, factores como el crecimiento demográfico, la urbanización, las migraciones humanas y el cambio climático promueven el riesgo de que brotes de infecciones emergentes se propaguen con rapidez y puedan, finalmente, evolucionar a pandemias; y la mejor manera de prevenirlo es disponer de vacunas que puedan usarse de inmediato (Berkley 2022). Claro está que para ello es necesario conocer de antemano los posibles patógenos potencialmente pandémicos. La OMS ha elaborado una lista de las enfermedades con mayor riesgo para la salud pública, sobre las que se deberían focalizar los esfuerzos de investigación y desarrollo de vacunas. La lista actual es la siguiente (https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts):

— COVID-19.
— Fiebre hemorrágica de Crimea-Congo.
— Enfermedades causadas por los virus Ébola y Marburg.
— Fiebre de Lassa.
— Síndromes respiratorios por MERS-CoV y SARS-CoV.
— Enfermedades por Henipavirus (virus Nipah y Hendra).
— Fiebre del Valle del Rift.
— Virus Zika.
— «Enfermedad X».

Las ocho enfermedades identificadas por sus agentes causales se deben a virus. La «Enfermedad X» representa una epidemia grave o una pandemia causada por un patógeno desconocido; en este caso la estrategia a seguir consistiría en disponer de un conjunto de sistemas de entrega de mRNA y/o de vectores virales capaces de incorporar las secuencias de cualquier antígeno protector, que se identificarían una vez secuenciado el genoma del nuevo patógeno (vacunología inversa, ver sección 1.3.3); los trabajos de fabricación, ensayos preclínicos y clínicos debieran realizarse anticipadamente, en la medida de lo posible, para tener las nuevas vacunas disponibles con la mayor rapidez (Berkley 2022).

Otro aspecto para considerar es la desconfianza hacia las nuevas vacunas. A pesar de su innegable éxito, las vacunas frente a la COVID-19 han suscitado en amplios sectores de la población preocupaciones sobre su seguridad y eficacia. La pandemia ha ocurrido en plena era de la información digital, lo que se ha traducido en un volumen abrumador de información, buena parte de la cual era infundada, sesgada o francamente falsa, mientras que la información correcta a menudo era de difícil comprensión para el gran público, que no tenía nada fácil distinguir la realidad de la ficción (Lu *et al.* 2023). Se ha observado que la información errónea sobre las vacunas frente a la COVID-19 se refirió principalmente a su seguridad, eficacia y necesidad, pero también se difundieron diversas teorías de conspiración (Smith *et al.* 2023). Un estudio reciente ha mostrado que de los vídeos sobre vacunas para la COVID-19 subidos a YouTube, muchos eran inexactos, engañosos o claramente contrarios a las vacunas (Narayanan y Basch 2023).

La desinformación sobre vacunas es un problema grave, ya que la vacunación es la intervención de salud pública más eficaz y rentable en la prevención de las enfermedades infecciosas. Una de las lecciones de la pandemia de COVID-19 es, por tanto, la importancia de influir positivamente en la opinión pública sobre las vacunas. Los gobiernos deberán implementar medios para orientar a la población, ofreciendo información fiable basada en evidencias; es necesario que las organizaciones de salud pública y los profesionales de la salud tengan presencia en los medios de comunicación y en Internet y ejerzan influencia en las redes sociales; y, por supuesto, es esencial el papel de la educación, que ha de mejorar la capacidad de los ciudadanos para evaluar y seleccionar la información que les llegue y para acceder a información veraz (Lu *et al.* 2023; Smith *et al.* 2023).

Obviamente, la información veraz no debe nunca ignorar los aspectos razonablemente críticos ni ocultar los inconvenientes reales de las vacunas, tales como aquellos efectos adversos que hayan sido debidamente documentados. El protagonismo que han adquirido las vacunas de mRNA en la lucha contra la pandemia es, de nuevo, un buen ejemplo. Aunque el potencial de esta plataforma de vacunas era previsible desde hace años, su eficacia ha quedado demostrada y está impulsando su aplicación a la prevención de otras enfermedades infecciosas y a la inmunoterapia de ciertas formas de cáncer. Sin embargo, es necesario continuar investigando para conocer mejor aspectos de su farmacocinética y seguridad, y así garantizar su uso que previsiblemente se generalizará en un futuro próximo (Perrotta *et al.* 2023).

BIBLIOGRAFÍA

ABBINK, P., LEMCKERT, A.A., EWALD, B.A., ..., GOUDSMIT, J., HAVENGA, M.J. & BAROUCH, D.H. (2007), Comparative Seroprevalence and Immunogenicity of Six Rare Serotype Recombinant Adenovirus Vaccine Vectors from Subgroups B and D. Journal of Virology 81(9): 4654-4663.

ABDELNABI, R., PÉREZ, P., ASTORGANO, D., ..., DALLMEIER, K., ESTEBAN, M. & GARCÍA-ARRIAZA, J. (2023), Optimized Vaccine Candidate MVA-S(3P) Fully Protects against SARS-CoV-2 Infection in Hamsters. Frontiers in Immunology 14: 1163159.

ADAMO, S., CHEVRIER, S., CERVIA, C., ..., BODENMILLER, B., BOYMAN, O. & NILSSON, J. (2021), Profound Dysregulation of T Cell Homeostasis and Function in Patients with Severe COVID-19. Allergy 76(9): 2866-2881.

ALBECKA, A., CLIFT, D., VAYSBURD, M., ..., FAVARA, D.M., BAXENDALE, H.E. & JAMES, L.C. (2021), A Functional Assay for Serum Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 Nucleoprotein. EMBO Journal 40(17): e108588.

ALCOLEA, P.J., ALONSO, A. & LARRAGA, V. (2019), The Antibiotic Resistance-Free Mammalian Expression Plasmid Vector pPAL for Development of Third Generation Vaccines. Plasmid 101: 35-42.

ALCOLEA, P.J., LARRAGA, J., RODRÍGUEZ-MARTÍN, D., ..., MARTÍN, V., SEVILLA, N. & LARRAGA, V. (2022), Non-Replicative Antibiotic Resistance-Free DNA Vaccine Encoding S and N Proteins Induces Full Protection in Mice against SARS-CoV-2. Frontiers in Immunology 13: 1023255.

ALDÉN, M., OLOFSSON FALLA, F., ..., LUAN, C., RASMUSSEN, M. & DE MARINIS, Y. (2022), Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. Current Issues in Molecular Biology 44(3): 1115-1126.

ALHARBI, N.K., PADRON-REGALADO, E., THOMPSON, C.P., ..., BECKER, S., HILL, A.V.S. & GILBERT, S.C. (2017), ChAdOx1 and MVA Based Vaccine

Candidates against MERS-CoV Elicit Neutralising Antibodies and Cellular Immune Responses in Mice. Vaccine 35(30): 3780-3788.

ALLEVA, D.G., DELPERO, A.R., SCULLY, M.M., ..., KARNES, L., SOLLIE, F. & ZION, T.C. (2021), Development of an IgG-Fc Fusion COVID-19 Subunit Vaccine, AKS-452. Vaccine 39(45): 6601-6613.

ALSHRARI, A.S., HUDU, S.A., IMRAN, M., ASDAQ, S.M.B., ALI, A.M. & RABBANI, S.I. (2022), Innovations and Development of COVID-19 Vaccines: A Patent Review. Journal of Infection and Public Health 15(1): 123-131.

ALU, A., CHEN, L., LEI, H., WEI, Y., TIAN, X. & WEI, X. (2022), Intranasal COVID-19 Vaccines: From Bench to Bed. EBioMedicine 76: 103841.

AMANAT, F., STROHMEIER, S., RATHNASINGHE, R., SCHOTSAERT, M., COUGHLAN, L., GARCÍA-SASTRE, A. & KRAMMER, F. (2021), Introduction of Two Prolines and Removal of the Polybasic Cleavage Site Lead to Higher Efficacy of a Recombinant Spike-Based SARS-CoV-2 Vaccine in the Mouse Model. mBio 12(2): e02648-20.

AMBAGALA, A.P., SOLHEIM, J.C. & SRIKUMARAN, S. (2005), Viral Interference with MHC Class I Antigen Presentation Pathway: The Battle Continues. Veterinary Immunology and Immunopathology 107(1-2): 1-15.

ANDERSSON, N.W., THIESSON, E.M., LAURSEN, M.V., MOGENSEN, S.H., KJÆR, J. & HVIID, A. (2022), Safety of Heterologous Primary and Booster Schedules with ChAdOx1-S and BNT162b2 or mRNA-1273 Vaccines: Nationwide Cohort Study. BMJ 378: e070483.

ANDRÉ, F.E. (2003), Vaccinology: Past Achievements, Present Roadblocks and Future Promises. Vaccine 21(7-8): 593-595.

ANDREWS, N., TESSIER, E., STOWE, J., ..., LADHANI, S.N., RAMSAY, M. & LOPEZ BERNAL, J. (2022), Duration of Protection against Mild and Severe Disease by COVID-19 Vaccines. New England Journal of Medicine 386(4): 340-350.

ANGELI, F., REBOLDI, G., TRAPASSO, M., SANTILLI, G., ZAPPA, M. & VERDECCHIA, P. (2022), Blood Pressure Increase Following COVID-19 Vaccination: A Systematic Overview and Meta-Analysis. Journal of Cardiovascular Development and Disease 9(5): 150.

ANGELI, F., ZAPPA, M. & VERDECCHIA, P. (2023), Newer COVID-19 Vaccines: Still Lights and Shadows? European Journal of Internal Medicine S0953-6205(23): 00380-1.

AOSHI, T. (2017), Modes of Action for Mucosal Vaccine Adjuvants. Viral Immunology 30(6): 463-470.

AZMI, F., AHMAD FUAAD, A.A., SKWARCZYNSKI, M. & TOTH, I. (2014), Recent Progress in Adjuvant Discovery for Peptide-Based Subunit Vaccines. Human Vaccines and Immunotherapy 10(3): 778-796.

BALOCH, Z., IKRAM, A., SHAMIM, S., ..., RAUFF, B., GILANI, K. & QURESHI, J.A. (2022), Human Coronavirus Spike Protein Based Multi-Epitope Vaccine against COVID-19 and Potential Future Zoonotic Coronaviruses by Using Immunoinformatic Approaches. Vaccines (Basel) 10(7): 1150.

BANIHASHEMI, S.R., ES-HAGHI, A., FALLAH MEHRABADI, M.H., ..., LOTFI, M., KHORASANI, A. & RAHMANI, F. (2022), Safety and Efficacy of Combined Intramuscular/Intranasal RAZI-COV PARS Vaccine Candidate against SARS-CoV-2: A Preclinical Study in Several Animal Models. Frontiers in Immunology 13: 836745.

BAO, L., DENG, W., HUANG, B., ..., JIN, Q., WU, G. & QIN, C. (2020), The Pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 Transgenic Mice. Nature 583(7818): 830-833.

BARREIRO, A., PRENAFETA, A., BECH-SABAT, G., ..., CEBOLLADA RICA, P., MEYERHANS, A. & FERRER, L. (2023), Preclinical Evaluation of a COVID-19 Vaccine Candidate Based on a Recombinant RBD Fusion Heterodimer of SARS-CoV-2. iScience. 26(3): 106126.

BARTH, R.F., BUJA, L.M., BARTH, A.L., CARPENTER, D.E. & PARWANI, A.V. (2021), A Comparison of the Clinical, Viral, Pathologic, and Immunologic Features of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS), and Coronavirus 2019 (COVID-19) Diseases. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 145(10): 1194-1211.

BARTSCH, Y.C., WANG, C., ZOHAR, T., ..., LAUFFENBURGER, D.A., YONKER, L.M. & ALTER, G. (2021), Humoral Signatures of Protective and Pathological SARS-CoV-2 Infection in Children. Nature Medicine 27(3): 454-462.

BERKLEY, S. (2022), Even after COVID, the World's Vaccine Strategy is Failing. Nature. 612(7940): 377.

BHAGCHANDANI, S., JOHNSON, J.A. & IRVINE, D.J. (2021), Evolution of Toll-Like Receptor 7/8 Agonist Therapeutics and Their Delivery Approaches: From Antiviral Formulations to Vaccine Adjuvants. Advanced Drug Delivery Reviews 175: 113803.

BLAKEWAY, H., PRASAD, S., KALAFAT, E., ..., REZVANI, A., VON DADELSZEN, P. & KHALIL, A. (2022), COVID-19 Vaccination during Pregnancy: Coverage and Safety. American Journal of Obstetrics and Gynecology 226(2): 236.e1-236.e14.

BLEIER, B.S., RAMANATHAN, M.J.R. & LANE, A.P. (2021), COVID-19 Vaccines May Not Prevent Nasal SARS-CoV-2 Infection and Asymptomatic

Transmission. Otolaryngology- Head and Neck Surgery 164(2): 305-307.

BLOOM, K., VAN DEN BERG, F. & ARBUTHNOT, P. (2021), Self-Amplifying RNA Vaccines for Infectious Diseases. Gene Therapy 28(3-4): 117-129.

BLUMBERG, D., SRIDHAR, A., LAKSHMINRUSIMHA, S., HIGGINS, R.D. & SAADE, G. (2021), COVID-19 Vaccine Considerations during Pregnancy and Lactation. American Journal of Perinatology 38(6): 523-528.

BOETTLER, T., CSERNALABICS, B., SALIÉ H, ..., THIMME, R., HOFMANN, M. & BENGSCH, B. (2022), SARS-CoV-2 Vaccination Can Elicit a CD8 T-Cell Dominant Hepatitis. Journal of Hepatology 77(3): 653-659.

BOUDEWIJNS, R., PÉREZ, P., LÁZARO-FRÍAS, A., ..., DALLMEIER, K., ESTEBAN, M. & GARCÍA-ARRIAZA, J. (2022), MVA-CoV2-S Vaccine Candidate Neutralizes Distinct Variants of Concern and Protects against SARS-CoV-2 Infection in Hamsters. Frontiers in Immunology 13: 845969.

BOS, R., RUTTEN, L., VAN DER LUBBE, J.E.M., ..., ZAHN, R.C., CUSTERS, J. & SCHUITEMAKER, H. (2020), Ad26 Vector-Based COVID-19 Vaccine Encoding a Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spike Immunogen Induces Potent Humoral and Cellular Immune Responses. NPJ Vaccines 5: 91.

BRANDTZAEG, P., KIYONO, H., PABST, R. & RUSSELL, M.W. (2008), Terminology: Nomenclature of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Mucosal Immunology 1(1): 31-37.

BREWER, J.M., POLLOCK, K.G., TETLEY, L. & RUSSELL, D.G. (2004), Vesicle Size Influences the Trafficking, Processing, and Presentation of Antigens in Lipid Vesicles. Journal of Immunology 173(10): 6143-6150.

BREWER, R.C., RAMADOSS, N.S., LAHEY, L.J., JAHANBANI, S., ROBINSON, W.H. & LANZ, T.V. (2022), BNT162b2 Vaccine Induces Divergent B Cell Responses to SARS-CoV-2 S1 and S2. Nature Immunology 23(1): 33-39.

BRISSE, M., VRBA, S.M., KIRK, N., LIANG, Y. & LY, H. (2020), Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. Frontiers in Immunology 11: 583077.

BROCKSTEDT, D.G., BAHJAT, K.S., GIEDLIN, M.A., ..., PORTNOY, D.A., COOK, D.N. & DUBENSKY, T.W. JR. (2005), Killed but Metabolically Active Microbes: A New Vaccine Paradigm for Eliciting Effector T-Cell Responses and Protective Immunity. Nature Medicine 11(8): 853-860.

BUNTINX, E., BROCHADO, L., BORJA-TABORA, C., ..., LI, P., BACCARINI, C. & SMOLENOV, I. (2023), Immunogenicity of an Adjuvanted SARS-CoV-2 Trimeric S-Protein Subunit Vaccine (SCB-2019) in SARS-CoV-2-Naïve and Exposed Individuals in a Phase 2/3, Double-Blind, Randomized Study. Vaccine 41(11): 1875-1884.

BURNS, K.H. & BOEKE, J.D. (2012), Human Transposon Tectonics. Cell 149(4): 740-752.

CAI, Y., ZHANG, J., XIAO, T., ..., RAWSON, S., RITS-VOLLOCH, S. & CHEN, B. (2020), Distinct Conformational States of SARS-CoV-2 Spike Protein. Science 369(6511): 1586-1592.

CALDRER, S., MAZZI, C., BERNARDI, M., ..., ANGHEBEN, A., PIUBELLI, C. & TIBERTI, N. (2021), Regulatory T Cells as Predictors of Clinical Course in Hospitalised COVID-19 Patients. Frontiers in Immunology 12: 789735.

CALLAWAY, E. & NADDAF, M. (2023), Pioneers of mRNA COVID Vaccines Win Medicine Nobel. Nature 622(7982): 228-229.

CANTINI, F., GOLETTI, D., PETRONE, L., NAJAFI FARD, S., NICCOLI, L. & FOTI, R. (2020), Immune Therapy, or Antiviral Therapy, or Both for COVID-19: A Systematic Review. Drugs 80(18): 1929-1946.

CARABELLI, A.M., PEACOCK, T.P., THORNE, L.G., ..., DE SILVA, T.I., TOWERS, G.J. & ROBERTSON, D.L. (2023), SARS-CoV-2 Variant Biology: Immune Escape, Transmission and Fitness. Nature Reviews Microbiology 21(3): 162-177.

CAVALERI, M., ENZMANN, H., STRAUS, S. & COOKE, E. (2021), The European Medicines Agency's EU Conditional Marketing Authorisations for COVID-19 Vaccines. The Lancet. 397(10272): 355-357.

CHAN, J.F., ZHANG, A.J., YUAN, S., ..., CHEN, H., TO, K.K. & YUEN, K.Y. (2020), Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. Clinical Infectious Diseases 71(9): 2428-2446.

CHEN, Z. & JOHN WHERRY, E. (2020), T Cell Responses in Patients with COVID-19. Nature Reviews Immunology 20(9): 529-536.

CHIUPPESI, F., ZAIA, J.A., FAIRCLOTH, K., ..., WUSSOW, F., DADWAL, S. & DIAMOND, D.J. (2022), Vaccine-Induced Spike- and Nucleocapsid-Specific Cellular Responses Maintain Potent Cross-Reactivity to SARS-CoV-2 Delta and Omicron Variants. iScience 25(8): 104745.

CHOI, K.S. (2017), Newcastle Disease Virus Vectored Vaccines as Bivalent or Antigen Delivery Vaccines. Clinical and Experimental Vaccine Research 6(2): 72-82.

CHOTEAU, M., SCOHY, A., MESSE, S., ..., LIMAYE, N., MICHIELS, T. & DUMOUTIER, L. (2022), Development of SARS-CoV2 Humoral Response Including Neutralizing Antibodies Is Not Sufficient to Protect

Patients against Fatal Infection. Sci entific Reports 12(1): 2077.

CONZELMANN, K.K. (1996), Genetic Manipulation of Non-Segmented Negative-Strand RNA Viruses. Journal of General Virology 77 (Pt 3): 381-389.

CORBETT, K.S., EDWARDS, D.K., LEIST, S.R., ..., BARIC, R.S., CARFI, A. & GRAHAM, B.S. (2020a), SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Design Enabled by Prototype Pathogen Preparedness. Nature 586(7830): 567-571.

CORBETT, K.S., FLYNN, B., FOULDS, K.E., ..., ROEDERER, M., SEDER, R.A. & GRAHAM, B.S. (2020b), Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. New England Journal of Medicine 383(16): 1544-1555.

COROMINAS, J., GARRIGA, C., PRENAFETA, A., ..., PRAT, T., TORROELLA, È. & FERRER, L. (2023), Safety and Immunogenicity of the Protein-Based PHH-1V Compared to BNT162b2 as a Heterologous SARS-CoV-2 Booster Vaccine in Adults Vaccinated against COVID-19: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Non-Inferiority Phase IIb Trial. The Lancet Regional Health Europe 28: 100613.

CORTI, C., ANTONARELLI, G., SCOTTÉ, F., ..., MICHOT, J.M., ANDRÉ, F. & CURIGLIANO, G. (2022), Seroconversion Rate after Vaccination against COVID-19 in Patients with Cancer – A Systematic Review. Annales of Oncology 33(2): 158-168.

COSTANZO, M., DE GIGLIO, M.A.R. & ROVIELLO, G.N. (2022), Anti-Coronavirus Vaccines: Past Investigations on SARS-CoV-1 and MERS-CoV, the Approved Vaccines from BioNTech/Pfizer, Moderna, Oxford/AstraZeneca and Others under Development against SARS-CoV-2 Infection. Current Medicinal Chemistry 29(1): 4-18.

COUPAR, B.E., PURCELL, D.F., THOMSON, S.A., RAMSHAW, I.A., KENT, S.J. & BOYLE, D.B. (2006), Fowlpox Virus Vaccines for HIV and SHIV Clinical and Pre-Clinical Trials. Vaccine 24(9): 1378-1388.

CROMER, D., JUNO, J.A., KHOURY, D., REYNALDI, A., WHEATLEY, A.K., KENT, S.J. & DAVENPORT, M.P. (2021), Prospects for Durable Immune Control of SARS-CoV-2 and Prevention of Reinfection. Nature Reviews Immunology 21(6): 395-404.

CRUZ-GONZÁLEZ, I., SÁNCHEZ-LEDESMA, M., SÁNCHEZ, P.L. & JANG, I.K. (2007), Trombocitopenia inducida por heparina [Heparin-induced thrombocytopenia]. Revista Española de Cardiología 60(10): 1071-1082.

DATTA, M., SINGH, D.D. & NAQVI, A.R. (2021), Molecular Diagnostic Tools for the Detection of SARS-CoV-2. International Reviews in Immunology 40(1-2): 143-156.

DE BRUYN, G., WANG, J., PURVIS, A., ..., SAVARINO, S., SRIDHAR, S. *et al.,* on behalf of the VAT00002 Booster Cohorts Study Team (2023), Safety and Immunogenicity of a Variant-Adapted SARS-CoV-2 Recombinant Protein Vaccine with AS03 Adjuvant as a Booster in Adults Primed with Authorized Vaccines: A Phase 3, Parallel-Group Study. EClinicalMedicine 62: 102109.

DE CANDIA, P., PRATTICHIZZO, F., GARAVELLI, S. & MATARESE, G. (2021), T Cells: Warriors of SARS-CoV-2 Infection. Trends in Immunology 42(1): 18-30.

DE ROSE, D.U., SALVATORI, G., DOTTA, A. & AURITI, C. (2022), SARS-CoV-2 Vaccines during Pregnancy and Breastfeeding: A Systematic Review of Maternal and Neonatal Outcomes. Viruses 14(3): 539.

DICKS, M.D., SPENCER, A.J., EDWARDS, N.J., ..., GILBERT, S.C., HILL, A.V. & COTTINGHAM, M.G. (2012), A Novel Chimpanzee Adenovirus Vector with Low Human Seroprevalence: Improved Systems for Vector Derivation and Comparative Immunogenicity. PLoS One. 7(7): e40385.

DING, C., MA, J., DONG, Q. & LIU, Q. (2018), Live Bacterial Vaccine Vector and Delivery Strategies of Heterologous Antigen: A Review. Immunology Letters 197: 70-77.

DODD, C., ANDREWS, N., PETOUSIS-HARRIS, H., STURKENBOOM, M., OMER, S.B. & BLACK, S. (2021), Methodological Frontiers in Vaccine Safety: Qualifying Available Evidence for Rare Events, Use of Distributed Data Networks to Monitor Vaccine Safety Issues and Monitoring the Safety of Pregnancy Interventions. BMJ Glob Health. 6(Suppl 2): e003540.

DOGAN, M., KOZHAYA, L., PLACEK, L., ..., GUPTA, R., ALPAN, O. & UNUTMAZ, D. (2021), SARS-CoV-2 Specific Antibody and Neutralization Assays Reveal the Wide Range of the Humoral Immune Response to Virus. Communications Biology 4(1): 129.

DOLGIN, E. (2021), The Tangled History of mRNA Vaccines. Nature 597(7876): 318-324.

DOLGIN, E. (2022), Pan-Coronavirus Vaccine Pipeline Takes Form. Nature Reviews Drug Discovery 21(5): 324-326.

DONG, Y., DAI, T., WEI, Y., ZHANG, L., ZHENG, M. & ZHOU, F. (2020), A Systematic Review of SARS-CoV-2 Vaccine Candidates. Signal Transduction and Target Therapy 5(1): 237.

DUAN, M., DUAN, H., AN, Y., ..., DAI, L., XU, K. & GAO, G.F. (2023), A Booster of Delta-Omicron RBD-Dimer Protein Subunit Vaccine Augments Sera Neutralization of Omicron Sub-Variants BA.1/BA.2/BA.2.12.1/BA.4/BA.5. Emerging Microbes and Infections 12(1): e2179357.

EDRIDGE, A.W.D., KACZOROWSKA, J., HOSTE, A.C.R., ..., SASTRE, P., DEIJS, M. & VAN DER HOEK, L. (2020), Seasonal Coronavirus Protective Immunity Is Short-Lasting. Nature Medicine 26(11): 1691-1693.

ELVEBORG, S., MONTEIL, V.M. & MIRAZIMI, A. (2022), Methods of Inactivation of Highly Pathogenic Viruses for Molecular, Serology or Vaccine Development Purposes. Pathogens. 11(2): 271.

ENJUANES, L., ZUÑIGA, S., CASTAÑO-RODRIGUEZ, C., GUTIERREZ-ALVAREZ, J., CANTON, J. & SOLA, I. (2016), Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. Advances in Virus Research 96: 245-286.

ERTL, H.C.J., CURRIE, S.L. & LIVERMORE, D.M. (2022), Back to the Future: ¿Can Vaccines Win the Long-Term Fight against COVID-19? Frontiers in Public Health. 10: 929445.

ESPOSITO, S., DURANDO, P., BOSIS, S., ANSALDI, F., TAGLIABUE, C., ICARDI, G. & ESCMID vaccine study group (EVASG) (2014), Vaccine-Preventable Diseases: From Paediatric to Adult Targets. European Journal of Internal Medicine 25(3): 203-212.

EWER, K.J., BARRETT, J.R., BELIJ-RAMMERSTORFER, S., ..., POLLARD, A.J., LAMBE, T. & Oxford COVID Vaccine Trial Group (2021), T Cell and Antibody Responses Induced by a Single Dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) Vaccine in a Phase 1/2 Clinical Trial. Nature Medicine 27(2): 270-278.

EXCLER, J.L. & KIM, J.H. (2019), Novel Prime-Boost Vaccine Strategies against HIV-1. Expert Review of Vaccines 18(8): 765-779.

FALSEY, A.R., SOBIESZCZYK, M.E., HIRSCH, I., ..., VILLAFANA, T., GONZALEZ-LOPEZ, A. & AstraZeneca AZD1222 Clinical Study Group (2021), Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) COVID-19 Vaccine. New England Journal of Medicine 385(25): 2348-2360.

FANG, E., LIU, X., LI, M., ..., LIU, J., ZHAO, D. & LI, Y. (2022), Advances in COVID-19 mRNA Vaccine Development. Signal Transduction and Targeted Therapy 7(1): 94.

FANG, L., XU, J., ZHAO, Y., FAN, J., SHEN, J., LIU, W. & CAO, G. (2023), The Effects of Amino Acid Substitution of Spike Protein and Genomic Recombination on the Evolution of SARS-CoV-2. Frontiers in Microbiology 14: 1228128.

FAUCI, A.S. & FOLKERS, G.K. (2023), Pandemic Preparedness and Response: Lessons from COVID-19. Journal of Infectious Diseases 228(4): 422-425.

FAUREZ, F., DORY, D., LE MOIGNE, V., GRAVIER, R. & JESTIN, A. (2010), Biosafety of DNA Vaccines: New Generation of DNA Vectors and Current Knowledge on the Fate of Plasmids after Injection. Vaccine 28(23): 3888-3895.

FEITSMA, E.A., JANSSEN, Y.F., BOERSMA, H.H., ..., BROM, M., VAN DAM, G.M. & ZION, T.C. (2023), A Randomized Phase I/II Safety and Immunogenicity Study of the Montanide-Adjuvanted SARS-CoV-2 Spike Protein-RBD-Fc Vaccine, AKS-452. Vaccine 41(13): 2184-2197.

FENDLER, A., DE VRIES, E.G.E., GEURTSVANKESSEL, C.H, HAANEN, J.B., WÖRMANN, B., TURAJLIC, S. & VON LILIENFELD-TOAL, M. (2022), COVID-19 Vaccines in Patients with Cancer: Immunogenicity, Efficacy, and Safety. Nature Reviews Clinical Oncology 19(6): 385-401.

FILCHAKOVA, O., DOSSYM, D., ILYAS, A., KUANYSHEVA, T., ABDIZHAMIL, A. & BUKASOV, R. (2022), Review of COVID-19 Testing and Diagnostic Methods. Talanta 244: 123409.

FIOLET, T., KHERABI, Y., MACDONALD, C.J., GHOSN, J. & PEIFFER-SMADJA, N. (2022), Comparing COVID-19 Vaccines for Their Characteristics, Efficacy and Effectiveness against SARS-CoV-2 and Variants of Concern: A Narrative Review. Clinical Microbiology and Infection 28(2): 202-221.

FOCOSI, D., MAGGI, F. & CASADEVALL, A. (2022), Mucosal Vaccines, Sterilizing Immunity, and the Future of SARS-CoV-2 Virulence. Viruses. 14(2): 187.

FOLEGATTI, P.M., EWER, K.J., ALEY, P.K., ..., GILBERT, S.C., POLLARD, A.J. & Oxford COVID Vaccine Trial Group (2020), Safety and Immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine against SARS-CoV-2: A Preliminary Report of a Phase 1/2, Single-Blind, Randomised Controlled Trial. The Lancet. 396(10249): 467-478.

FRANCICA, J.R., FLYNN, B.J., FOULDS, K.E., ..., GRAHAM, B.S., CASIMIRO, D. & SEDER, R.A. (2021), Protective Antibodies Elicited by SARS-CoV-2 Spike Protein Vaccination Are Boosted in the Lung after Challenge in Nonhuman Primates. Science Translational Medicine 13(607): eabi4547.

FRANCIS, M.J. (2018), Recent Advances in Vaccine Technologies. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 48(2): 231-241.

GALMICHE, S, LUONG NGUYEN, L.B., TARTOUR, E, DE LAMBALLERIE X, WITTKOP, L., LOUBET, P. & LAUNAY, O. (2022), Immunological and Clinical Efficacy of COVID-19 Vaccines in Immunocompromised Populations: A Systematic Review. Clinical Microbiology and Infection 28(2): 163-177.

GANNERU, B., JOGDAND, H., DARAM, V.K., ..., BASU, A., GUPTA, N. & VADREVU, K.M. (2021), Th1 Skewed Immune Response of Whole Virion Inactivated SARS CoV 2 Vaccine and Its Safety Evaluation. iScience. 24(4): 102298.

GAO, Q., BAO, L., MAO, H., ..., YIN, W., ZHANG, Y. & QIN, C. (2020), Development of an Inactivated Vaccine Candidate for SARS-CoV-2. Science 369(6499): 77-81.

GAO, L., LI, Y., HE, P., ..., YING, Z., SUN, J. & ZUO, X. (2023), Safety and Immunogenicity of a Protein Subunit COVID-19 Vaccine (ZF2001) in Healthy Children and Adolescents Aged 3-17 Years in China: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1 Trial and an Open-Label, Non-Randomised, Non-Inferiority, Phase 2 Trial. The Lancet Child and Adolescent Health 7(4): 269-279.

GARCÍA-ARRIAZA, J. & ESTEBAN, M. (2014), Enhancing Poxvirus Vectors Vaccine Immunogenicity. Human Vaccines and Immunotherapeutics 10(8): 2235-2244.

GARCÍA-ARRIAZA, J., GARAIGORTA, U., PÉREZ, P., ..., SORZANO, C.Ó.S., SANCHO, D. & ESTEBAN, M. (2021), COVID-19 Vaccine Candidates Based on Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing the SARS-CoV-2 Spike Induce Robust T- and B-Cell Immune Responses and Full Efficacy in Mice. Journal of Virology 95(7): e02260-20.

GASTEIGER, G., D'OSUALDO, A., SCHUBERT, D.A., WEBER, A., BRUSCIA, E.M. & HARTL, D. (2017), Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. Journal of Innate Immunology 9(2): 111-125.

GEORG, P., ASTABURUAGA-GARCÍA, R., BONAGURO, L., ..., BLÜTHGEN, N., SAWITZKI, B. & PA-COVID-19 Study Group (2022), Complement Activation Induces Excessive T Cell Cytotoxicity in Severe COVID-19. Cell 185(3): 493-512.e25.

GILBERT, S.C. & WARIMWE, G.M. (2017), Rapid Development of Vaccines against Emerging Pathogens: The Replication-Deficient Simian Adenovirus Platform Technology. Vaccine 35(35 Pt A): 4461-4464.

GONG, W., PARKKILA, S., WU, X. & ASPATWAR, A. (2023), SARS-CoV-2 Variants and COVID-19 Vaccines: Current Challenges and Future Strategies. International Reviews of Immunology 42(6): 393-414.

GRAHAM, R.L., DONALDSON, E.F. & BARIC, R.S. (2013), A Decade after SARS: Strategies for Controlling Emerging Coronaviruses. Nature Reviews Microbiology 11(12): 836-848.

GREANEY, A.J., LOES, A.N., CRAWFORD, K.H.D., STARR, T.N., MALONE, K.D., CHU, H.Y. & BLOOM, J.D. (2021), Comprehensive Mapping of Mutations in the SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain that Affect Recognition by Polyclonal Human Plasma Antibodies. Cell Host and Microbe 29(3): 463-476.e6.

GREINACHER, A., THIELE, T., WARKENTIN, T.E., WEISSER, K., KYRLE, P.A. & EICHINGER, S. (2021), Thrombotic Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCov-19 Vaccination. New England Journal of Medicine 384(22): 2092-2101.

GRGACIC, E.V. & ANDERSON, D.A. (2006), Virus-Like Particles: Passport to Immune Recognition. Methods 40(1): 60-65.

GUEST, S., PILIPENKO, E., SHARMA, K., CHUMAKOV, K. & ROOS, R.P. (2004), Molecular Mechanisms of Attenuation of the Sabin Strain of Poliovirus Type 3. Journal of Virology 78(20): 11097-11107.

HALPERIN, S.A., YE, L., MACKINNON-CAMERON, D., ..., GOU, J., ZHU, T. & CanSino COVID-19 Global Efficacy Study Group (2022), Final Efficacy Analysis, Interim Safety Analysis, and Immunogenicity of a Single Dose of Recombinant Novel Coronavirus Vaccine (Adenovirus Type 5 Vector) in Adults 18 Years and Older: An International, Multicentre, Randomised, Double-Blinded, Placebo-Controlled Phase 3 Trial. The Lancet 399(10321): 237-248.

HANNAWI, S., SAIFELDIN, L., ABUQUTA, A., ..., CHEN, Y., ZHOU, Q. & XIE, L. (2023a), Safety and Immunogenicity of a Tetravalent and Bivalent SARS-CoV-2 Protein Booster Vaccine in Men. Nature Communications 14(1): 4043.

HANNAWI, S., SAIFELDIN, L., ABUQUTA, A., ..., LI, J., CHEN, Y. & XIE, L. (2023b), Safety and Immunogenicity of a Bivalent SARS-CoV-2 Protein Booster Vaccine, SCTV01C in Adults Previously Vaccinated with Inactivated Vaccine: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1/2 Clinical Trial. Journal of Infection 86(2): 154-225.

HANNAWI, S., SAIFELDIN, L., ABUQUTA, A., ..., LIU, D., YAN, L. & XIE, L. (2023c), Safety and Immunogenicity of a Bivalent SARS-CoV-2 Protein Booster Vaccine, SCTV01C, in Adults Previously Vaccinated with mRNA Vaccine: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1/2 Clinical Trial. EBioMedicine. 87: 104386.

HARVEY, T.J., ANRAKU, I., LINEDALE, R., HARRICH, D., MACKENZIE, J., SUHRBIER, A. & KHROMYKH, A.A. (2003), Kunjin Virus Replicon Vectors for Human Immunodeficiency Virus Vaccine Development. Journal of Virology 77(14): 7796-7803.

HE, Q., MAO, Q., AN, C., ..., LIANG, Z., XU, M. & WANG, J. (2021), Heterologous Prime-Boost: Breaking the Protective Immune Response Bottleneck of COVID-19 Vaccine Candidates. Emerging Microbes and Infectious 10(1): 629-637.

HEATH, P.T., GALIZA, E.P., BAXTER, D.N., ..., SMITH, K. & TOBACK, S. (2021), 2019nCoV-302 STUDY GROUP. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 Vaccine. New England Journal of Medicine 385(13): 1172-1183.

HELDMAN, M.R. & LIMAYE, A.P. (2021), SARS-CoV-2 Vaccines in Kidney Transplant Recipients: Will They Be Safe and Effective and How Will We Know? Journal of the American Society of Nephrology 32(5): 1021-1024.

HENDRIKS, J., SCHASFOORT, R., KOERSELMAN, M., ..., KRABBE, J., MULDER, A.H.L. & KARPERIEN, M.

(2022), High Titers of Low Affinity Antibodies in COVID-19 Patients Are Associated with Disease Severity. Frontiers in Immunology 13: 867716.

HERNÁNDEZ-BERNAL, F., RICARDO-COBAS, M.C., MARTÍN-BAUTA, Y., ..., AYALA-ÁVILA, M., MUZIO-GONZÁLEZ, V.L., ABDALA Research Group (2023), A Phase 3, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial Evaluation of the Efficacy and Safety of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike RBD Protein Vaccine in Adults (ABDALA-3 Study). The Lancet Regional Health Americas 21: 100497.

HILLUS, D., SCHWARZ, T., TOBER-LAU, P., ..., KURTH, F., CORMAN, V.M. & SANDER, L.E. (2021), Safety, Reactogenicity, and Immunogenicity of Homologous and Heterologous Prime-Boost Immunisation with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2: A Prospective Cohort Study. The Lancet Respiratory Medicine 9(11): 1255-1265.

HO, N.I., HUIS, I.N. 'T VELD, G.M., RAAIJMAKERS, T.K. & ADEMA, G.J. (2018), Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? Frontiers in Immunology 9: 2874.

HOEPEL, W., CHEN, H.J., GEYER, C.E., ..., VIDARSSON, G., DE WINTHER, M. & DEN DUNNEN, J. (2021), High Titers and Low Fucosylation of Early Human Anti-SARS-CoV-2 IgG Promote Inflammation by Alveolar Macrophages. Science Translational Medicine 13(596): eabf8654.

HOGAN, M.J. & PARDI, N. (2022), mRNA Vaccines in the COVID-19 Pandemic and Beyond. Annual Review of Medicine 73: 17-39.

HOS, B.J., TONDINI, E., VAN KASTEREN, S.I. & OSSENDORP, F. (2018), Approaches to Improve Chemically Defined Synthetic Peptide Vaccines. Frontiers in Immunology 9: 884.

HOTEZ, P.J., BATISTA, C., AMOR, Y.B., ..., STRUB-WOURGAFT, N., YADAV, P. & BOTTAZZI, M.E. (2021), Global Public Health Security and Justice for Vaccines and Therapeutics in the COVID-19 Pandemic. EClinicalMedicine 39: 101053.

HOTEZ, P.J., ADHIKARI, R., CHEN, W.H., ..., WEI, J., ZHAN, B. & BOTTAZZI, M.E. (2023), From Concept to Delivery: A Yeast-Expressed Recombinant Protein-Based COVID-19 Vaccine Technology Suitable for Global Access. Expert Review of Vaccines. 22(1): 495-500.

HSIEH, C.L., GOLDSMITH, J.A., SCHAUB, J.M., ..., MAYNARD, J.A., FINKELSTEIN, I.J. & MCLELLAN, J.S. (2020), Structure-Based Design of Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spikes. Science 369(6510): 1501-1505.

HSU, A.C. (2018), Influenza Virus: A Master Tactician in Innate Immune Evasion and Novel Therapeutic Interventions. Frontiers in Immunology 9: 743.

HU, Z., NI, J., CAO, Y. & LIU, X. (2020), Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for 20 Years: A Focus on Maternally Derived Antibody Interference. Vaccines (Basel). 8(2): 222.

HWANG, Y.C., LU, R.M., SU, S.C., ..., LIANG, K.H., HSIEH, T.Y. & WU, H.C. (2022), Monoclonal Antibodies for COVID-19 Therapy and SARS-CoV-2 Detection. Journal of Biomedical Science 29(1): 1.

IWASAKI. A. & MEDZHITOV, R. (2015), Control of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. Nature Immunology 16(4): 343-353.

IWASAKI, A. & OMER, S.B. (2020), Why and How Vaccines Work. Cell 183(2): 290-295.

IWASAKI, N., TERAWAKI, S., SHIMIZU, K., OIKAWA, D., SAKAMOTO, H., SUNAMI, K. & TOKUNAGA, F. (2021), Th2 Cells and Macrophages Cooperatively Induce Allergic Inflammation through Histamine Signaling. PLoS One 16(3): e0248158.

IWATA, S., SONOYAMA, T., KAMITANI, A., ..., OMOTO, S., IGARASHI, K. & ARIYASU, M. (2022), Phase 1/2 Clinical Trial of COVID-19 Vaccine in Japanese Participants: A Report of Interim Findings. Vaccine 40(27): 3721-3726.

JACKSON, L.A., ANDERSON, E.J., ROUPHAEL, N.G., ..., LEDGERWOOD, J.E., GRAHAM, B.S. & BEIGEL, J.H. (2020a), mRNA-1273 Study Group. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 – Preliminary Report. New England Journal of Medicine 383(20): 1920-1931.

JACKSON, N.A.C., KESTER, K.E., CASIMIRO, D., GURUNATHAN, S. & DEROSA, F. (2020b), The Promise of mRNA Vaccines: A Biotech and Industrial Perspective. NPJ Vaccines. 5: 11.

JEYANATHAN, M., AFKHAMI, S., SMAILL, F., MILLER, M.S., LICHTY, B.D. & XING, Z. (2020), Immunological Considerations for COVID-19 Vaccine Strategies. Nature Reviews Immunology 20(10): 615-632.

JIN. P., GUO, X., CHEN, W., ..., FENG, J., LI, J. & ZHU, F. (2022), Safety and immunogenicity of Heterologous Boost Immunization with an Adenovirus Type-5-Vectored and Protein-Subunit-Based COVID-19 Vaccine (Convidecia/ZF2001): A Randomized, Observer-Blinded, Placebo-Controlled Trial. PLoS Med. 19(5): e1003953.

JOHANSEN, M.D., IRVING, A., MONTAGUTELLI, X., ..., WARK, P.A., NOLD-PETRY, C.A. & HANSBRO, P.M. (2020), Animal and Translational Models of SARS-CoV-2 Infection and COVID-19. Mucosal Immunology 13(6): 877-891.

JOUBERT, E., KEKEH, A.C. & AMIN, C.N. (2022), COVID-19 and Novel mRNA Vaccines in Pregnancy: An Updated Literature Review. BJOG 129(1): 21-28.

JURASZEK, J., RUTTEN, L., BLOKLAND, S., ..., BAKKERS, M.J.G., RENAULT, L.L.R. & LANGEDIJK, J.P.M.

(2021), Stabilizing the Closed SARS-CoV-2 Spike Trimer. Nature Communications. 12(1): 244.

KALIMUDDIN, S., THAM, C.Y.L., QUI, M., ..., OOI, E.E., BERTOLETTI, A. & LOW, J.G. (2021), Early T Cell and Binding Antibody Responses Are Associated with COVID-19 RNA Vaccine Efficacy Onset. Med 2(6): 682-688.e4.

KANACK, A.J., SINGH, B., GEORGE, G., ..., BAYAS, A., GRILL, D.E. & PADMANABHAN, A. (2022), Persistence of Ad26.COV2.S-Associated Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia (VITT) and Specific Detection of VITT Antibodies. American Journal of Haematology 97(5): 519-526.

KARA, Z., AKÇIN, R., DEMIR, A.N., DINÇ, H.Ö., TAŞKIN, H.E., KOCAZEYBEK, B. & YUMUK, V.D. (2022), Antibody Response to SARS-CoV-2 Vaccines in People with Severe Obesity. Obesity Surgery 1-7.

KARCH, C.P. & BURKHARD, P. (2016), Vaccine Technologies: From Whole Organisms to Rationally Designed Protein Assemblies. Biochemical Pharmacology 120: 1-14.

KARIKÓ, K., MURAMATSU, H., LUDWIG, J. & WEISSMAN, D. (2011), Generating the Optimal mRNA for Therapy: HPLC Purification Eliminates Immune Activation and Improves Translation of Nucleoside-Modified, Protein-Encoding mRNA. Nucleic Acids Research 39(21): e142.

KARIKO, K., MURAMATSU, H., WELSH, F.A., LUDWIG, J., KATO, H., AKIRA, S. & WEISSMAN, D. (2008), Incorporation of Pseudouridine into mRNA Yields Superior Nonimmunogenic Vector with Increased Translational Capacity and Biological Stability. Molecular Therapy 16(11): 1833-1840.

KATO, S., HORITA, N. & UTSUNOMIYA, D. (2022), Incidence of Myocarditis after Messenger RNA Vaccine for COVID-19 in Young Male Recipients. American Journal of Cardiology 72: 159-161.

KAYNARCALIDAN, O., MORENO MASCARAQUE, S. & DREXLER, I. (2021), Vaccinia Virus: From Crude Smallpox Vaccines to Elaborate Viral Vector Vaccine Design. Biomedicines 9(12): 1780.

KAZACHENKA, A. & KASSIOTIS, G. (2021), SARS-CoV-2-Host Chimeric RNA-Sequencing Reads Do Not Necessarily Arise from Virus Integration into the Host DNA. Frontiers in Microbiology 12: 676693.

KIKKERT, M. (2020), Innate Immune Evasion by Human Respiratory RNA Viruses. Journal of Innate Immunology 12(1): 4-20.

KIM, S.H. & SAMAL, S.K. (2016), Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector for Development of Human and Veterinary Vaccines. Viruses 8(7): 183.

KLASSE, P.J., NIXON, D.F. & MOORE, J.P. (2021), Immunogenicity of Clinically Relevant SARS-CoV-2 Vaccines in Nonhuman Primates and Humans. Science Advances 7(12): eabe8065.

KORANG, S.K., VON ROHDEN, E., VERONIKI, A.A., ..., THOMSEN, A.R., JAKOBSEN, J.C. & GLUUD, C. (2022), Vaccines to Prevent COVID-19: A Living Systematic Review with Trial Sequential Analysis and Network Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. PLoS One 17(1): e0260733.

KUO, T.Y., LIN, M.Y., COFFMAN, R.L., ..., HUANG, C.G., TSAO, K.C. & CHEN, C. (2020), Development of CpG-Adjuvanted Stable Prefusion SARS-CoV-2 Spike Antigen as a Subunit Vaccine against COVID-19. Scientific Reports 10(1): 20085.

KRAMMER, F. (2023), The Role of Vaccines in the COVID-19 Pandemic: What Have We Learned? Seminars in Immunopathology.

KYAW, M.H., SPINARDI, J., ZHANG, L., OH, H.M.L. & SRIVASTAVA, A. (2023), Evidence Synthesis and Pooled Analysis of Vaccine Effectiveness for COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 as a Heterologous Booster after Inactivated SARS-CoV-2 Virus Vaccines. Human Vaccines and Immunotherapeutics 19(1): 2165856.

LADNER, J.T., HENSON, S.N., BOYLE, A.S., ..., CHEE, M.S., SHIRYAEV, S.A. & ALTIN, J.A. (2021), Epitope-Resolved Profiling of the SARS-CoV-2 Antibody Response Identifies Cross-Reactivity with Endemic Human Coronaviruses. Cell Rep Med. 2(1): 100189.

LAURING, A.S., JONES, J.O. & ANDINO, R. (2010), Rationalizing the Development of Live Attenuated Virus Vaccines. Nature Biotechnology 28(6): 573-579.

LAWSON, L.B., NORTON, E.B. & CLEMENTS, J.D. (2011), Defending the Mucosa: Adjuvant and Carrier Formulations for Mucosal Immunity. Current Opinion in Immunology 23(3): 414-420.

LÁZARO-FRÍAS, A., PÉREZ, P., ZAMORA C, ..., CASASNOVAS, J.M., ESTEBAN, M. & GARCÍA-ARRIAZA, J. (2022), Full Efficacy and Long-Term Immunogenicity Induced by the SARS-CoV-2 Vaccine Candidate MVA-CoV2-S in mice. NPJ Vaccines. 7(1): 17.

LEAL, L., PICH, J., FERRER, L., ..., TORROELLA, E., RAMOS, R. & HIPRA-HH-1 Study Group (2023), Safety and Immunogenicity of a Recombinant Protein RBD Fusion Heterodimer Vaccine against SARS-CoV-2. NPJ Vaccines. 8(1): 147.

LEE, E.J., CINES, D.B., GERNSHEIMER, T., ..., GODEAU, B., LAMBERT, M.P. & BUSSEL, J.B. (2021), Thrombocytopenia Following Pfizer and Moderna SARS-CoV-2 Vaccination. American Journal of Hematology 96(5): 534-537.

LI, Y.D., CHI, W.Y., SU, J.H., FERRALL, L., HUNG, C.F. & WU, T.C. (2020), Coronavirus Vaccine Development: From SARS and MERS to COVID-19. Journal of Biomedical Science 27(1): 104.

LI, M., WANG, H., TIAN, L., ..., SONG, L., TONG, Y. & FAN, H. (2022), COVID-19 Vaccine Development: Milestones, Lessons and Prospects. Signal Transduction and Target Therapy 7(1): 146.

LI, J.X. & ZHU, F.C. (2021), Adjuvantation Helps to Optimise COVID-19 Vaccine Candidate. The Lancet Infectious Diseases 21(7): 891-893.

LIAO, M., LIU, Y., YUAN, J., ..., AMIT, I., ZHANG, S. & ZHANG, Z. (2020), Single-Cell Landscape of Bronchoalveolar Immune Cells in Patients with COVID-19. Nature Medicine 26(6): 842-844.

LICHTENSTEIN, D.L., TOTH, K., DORONIN, K., TOLLEFSON, A.E. & WOLD, W.S. (2004), Functions and Mechanisms of Action of the Adenovirus E3 Proteins. International Reviews of Immunology 23(1-2): 75-111.

LIN, Y.J., LIN, M.Y., CHUANG, Y.S., ..., FATTOM, A., BITKO, V. & LIEN, C.E. (2022), Protection of Hamsters Challenged with SARS-CoV-2 after Two Doses of MVC-COV1901 Vaccine Followed by a Single Intranasal Booster with Nanoemulsion Adjuvanted S-2P Vaccine. Scientific Reports 12(1): 11369.

LING, R.R., RAMANATHAN, K., TAN, F.L., TAI, B.C., SOMANI, J., FISHER, D. & MACLAREN, G. (2022), Myopericarditis Following COVID-19 Vaccination and Non-COVID-19 Vaccination: A Systematic Review and Meta-Analysis. The Lancet Respiratory Medicine 10(7): 679-688.

LIU, MA. (2019), A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. Vaccines (Basel) 7(2): 37.

LIU, N., LEE, C.H, SWIGUT, T., GROW, E., GU, B., BASSIK, M.C. & WYSOCKA, J. (2018), Selective Silencing of Euchromatic L1s Revealed by Genome-Wide Screens for L1 Regulators. Nature 553(7687): 228-232.

LIU, Q., XIONG, Q., MEI, F., ..., YAN, H., CHEN, Y. & LAN, K. (2022a), Antibody Neutralization to SARS-CoV-2 and Variants after 1 Year in Wuhan, China. Innovation (N Y) 3(1): 100181.

LIU, S., KANG, M., ZHAO, N., ZHUANG, Y., LI, S. & SONG, T. (2022b), Comprehensive Narrative Review of Real-World COVID-19 Vaccines: Viewpoints and Opportunities. Medical Review (Berl) 2(2): 169-196.

LOGUNOV, D.Y., DOLZHIKOVA, I.V., ZUBKOVA, O.V., ..., BORISEVICH, S.V., NARODITSKY, B.S. & GINTSBURG, A.L. (2020), Safety and Immunogenicity of an rAd26 and rAd5 Vector-Based Heterologous Prime-Boost COVID-19 Vaccine in Two Formulations: Two Open, Non-Randomised Phase 1/2 Studies from Russia. The Lancet. 396(10255): 887-897.

LOPEZ, P., BRAVO, L., BUNTINX, E., ..., HAN, H.H., BACCARINI, C. & SMOLENOV, I. (2023), Safety and Immunogenicity of SCB-2019, an Adjuvanted, Recombinant SARS-CoV-2 Trimeric S-Protein Subunit COVID-19 Vaccine in Healthy 12-17-Year-Old Adolescents. Human Vaccines and Immunotherapy 19(1): 2206359.

LÖVGREN BENGTSSON, K., MOREIN, B. & OSTERHAUS, A.D. (2011), ISCOM Technology-Based Matrix M™ Adjuvant: Success in Future Vaccines Relies on Formulation. Expert Review of Vaccines 10(4): 401-403.

LU, Y., WANG, Q., ZHU, S., ..., ZHAO, N., FANG, Y. & CHANG, J. (2023), Lessons Learned from COVID-19 Vaccination Implementation: How Psychological Antecedents of Vaccinations Mediate the Relationship between Vaccine Literacy and Vaccine Hesitancy. Social Science and Medicine 336: 116270.

LUNDSTROM, K. (2019), RNA Viruses as Tools in Gene Therapy and Vaccine Development. Genes (Basel). 10(3): 189.

LUNDSTROM, K. (2020), Self-Amplifying RNA Viruses as RNA Vaccines. International Journal of Molecular Sciences 21(14): 5130.

LUNDSTROM, K. (2021), Impact of a Plasmid DNA-Based Alphavirus Vaccine on Immunization Efficiency. Methods in Molecular Biology 2197: 33-47.

LV, P., SONG, Y., LIU, C., ..., TANG, H., SUN, S. & WANG, F. (2020), Application of *Bacillus subtilis* as a Live Vaccine Vector: A Review. Journal of Veterinary Medical Science 82(11): 1693-1699.

MA, C., CHEN, X., MEI, F., ..., CHEN, Y., YAN, H. & LAN, K. (2022), Drastic Decline in Sera Neutralization against SARS-CoV-2 Omicron Variant in Wuhan COVID-19 Convalescents. Emerging Microbes and Infections 11(1): 567-572.

MA, Y., LI, X. & KUANG, E. (2016), Viral Evasion of Natural Killer Cell Activation. Viruses. 8(4): 95.

MAKATSA, M.S., TINCHO, M.B., WENDOH, J.M, ..., MAYNE, E.S., KEETON, R.S. & BURGERS, W.A. (2021), SARS-CoV-2 Antigens Expressed in Plants Detect Antibody Responses in COVID-19 Patients. Frontiers in Plant Science 12: 589940.

MALONIS, R.J, LAI, J.R. & VERGNOLLE, O. (2020), Peptide-Based Vaccines: Current Progress and Future Challenges. Chemical Reviews 120(6): 3210-3229.

MANN, J.F., SHAKIR, E., CARTER, K.C., MULLEN, A.B., ALEXANDER, J. & FERRO, V.A. (2009), Lipid Vesicle Size of an Oral Influenza Vaccine Delivery Vehicle Influences the Th1/Th2 Bias in the Immune Response and Protection against Infection. Vaccine. 27(27): 3643-3649.

MARSCHNER, C.A., SHAW, K.E., TIJMES, F.S, ..., UDELL, J.A., WALD, R.M. & HANNEMAN, K. (2022), Myocarditis Following COVID-19 Vaccination. Cardiology Clinics 40(3): 375-388.

MARSHALL, J.S., WARRINGTON, R., WATSON, W. & KIM, H.L. (2018), An Introduction to Immunology and Immunopathology. Allergy, Asthma and Clinical Immunology 14(Suppl 2): 49.

MARTÍN SÁNCHEZ, F.J., MARTÍNEZ-SELLÉS, M., MOLERO GARCÍA, J.M., ..., GONZÁLEZ DEL CASTILLO, J., MARTÍN-DELGADO, M.C. & BOUZA, E. (2023), Insights for COVID-19 in 2023. Revista Española de Quimioterapia 36(2): 114-124.

MARTINEZ, D.R., SCHÄFER, A., GOBEIL, S., ..., ACHARYA, P., HAYNES, B.F. & BARIC, R.S. (2022), A Broadly Cross-Reactive Antibody Neutralizes and Protects against Sarbecovirus Challenge in Mice. Science Translational Medicine 14(629): eabj7125.

MATHEW, D., GILES, J.R., BAXTER, A.E., ..., BETTS, M.R., MEYER, N.J., WHERRY, E.J. & UPenn COVID Processing Unit (2020), Deep Immune Profiling of COVID-19 Patients Reveals Distinct Immunotypes with Therapeutic Implications. Science 369(6508).

MCCRAY, P.B. Jr, PEWE, L., WOHLFORD-LENANE, C., ..., KIRBY, P., LOOK, D.C. & PERLMAN, S. (2007), Lethal Infection of K18-hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. Journal of Virology 81(2): 813-821.

MCGONAGLE, D., DE MARCO, G. & BRIDGEWOOD, C. (2021), Mechanisms of Immunothrombosis in Vaccine-Induced Thrombotic Thrombocytopenia (VITT) Compared to Natural SARS-CoV-2 Infection. Journal of Autoimmunity 121: 102662.

MEKALANOS, J.J. (1994), Live Bacterial Vaccines: Environmental Aspects. Current Opinion in Biotechnology 5(3): 312-319.

MELIN, A.D., JANIAK, M.C., MARRONE, F. III, ARORA, P.S. & HIGHAM, J.P. (2020), Comparative ACE2 Variation and Primate COVID-19 Risk. Communications in Biology 3(1): 641.

MERCADO, N.B., ZAHN, R., WEGMANN, F., ..., VAN HOOF, J., SCHUITEMAKER, H. & BAROUCH, D.H. (2020), Single-Shot Ad26 Vaccine Protects against SARS-CoV-2 in Rhesus Macaques. Nature 586(7830): 583-588.

MERCHANT, H.A. (2022), Comment on Aldén *et al.* Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. Curr. Issues Mol. Biol. 44, 1115-1126. Current Issues in Molecular Biology 44(4): 1661-1663.

MINOR, P.D. (2015), Live Attenuated Vaccines: Historical Successes and Current Challenges. Virology 479-480: 379-392.

MOHANDAS, S., YADAV, P.D., SHETE-AICH, A., ..., ELLA, K.M., PANDA, S. & BHARGAVA, B. (2021), Immunogenicity and Protective Efficacy of BBV152, Whole Virion Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine Candidates in the Syrian Hamster Model. iScience 24(2): 102054.

MOHAZZAB, A., FALLAH MEHRABADI, M.H., ES-HAGHI, A., ..., KHODADOOST, B., SOLAYMANI-DODARAN, M. & BANIHASHEMI, S.R. (2023), Phase II, Safety and Immunogenicity of RAZI Cov Pars (RCP) SARS Cov-2 Vaccine in Adults Aged 18-70 Years; A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. Journal of Pharmaceutical Sciences 112(12): 3012-3021.

MOHRAZ, M., VAHDAT, K., GHAMARI, S.H., ..., KHODASHAHI, R., SALEHI, M. & HOSSEINI, H. (2023), Efficacy and Safety of an Inactivated Virus-Particle Vaccine for SARS-CoV-2, BIV1-CovIran: Randomised, Placebo Controlled, Double Blind, Multicentre, Phase 3 Clinical Trial. BMJ 382: e070464.

MOHSENI AFSHAR, Z., BABAZADEH, A., JANBAKHSH, A., ..., HOSSEINZADEH, R., BARARY, M. & EBRAHIMPOUR, S. (2022), Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Vaccination Recommendations in Special Populations and Patients with Existing Comorbidities. Reviews in Medical Virology 32(3): e2309.

MOOIJ, P., GARCÍA-ARRIAZA, J., PÉREZ, P., ..., BOGERS, W.M.J.M., KOOPMAN, G. & ESTEBAN, M. (2022), Poxvirus MVA Expressing SARS-CoV-2 Protein Induces Robust Immunity and Protects Rhesus Macaques from SARS-CoV-2. Frontiers in Immunology 13: 845887.

NATHAN, A., ROSSIN, E.J., KASEKE, C., ..., CARRINGTON, M., WALKER, B.D. & GAIHA, G.D. (2021), Structure-Guided T Cell Vaccine Design for SARS-CoV-2 Variants and Sarbecoviruses. Cell 184(17): 4401-4413.e10.

NGUYEN, T.P., DO, Q., PHAN, L.T., ..., THUAN, U.T., DOAN, C.C. & DO, S.M. (2022), Safety and Immunogenicity of Nanocovax, a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Vaccine: Interim Results of a Double-Blind, Randomised Controlled Phase 1 and 2 Trial. The Lancet Regional Health – Western Pacific 24: 100474.

NYBERG, T., FERGUSON, N.M., NASH, S.G., ..., DE ANGELIS, D., PRESANIS, A.M. & THELWALL, S. (2022), Comparative Analysis of the Risks of Hospitalisation and Death Associated with SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) Variants in England: A Cohort Study. The Lancet. 399(10332): 1303-1312.

OMER, S.B. (2017), Maternal Immunization. New England Journal of Medicine 376(13): 1256-1267.

OUEIJAN, R.I., HILL, O.R., AHIAWODZI, P.D., FASINU, P.S. & THOMPSON, D.K. (2022), Rare Heterogeneous Adverse Events Associated with mRNA-Based COVID-19 Vaccines: A Systematic Review. Medicines (Basel) 9(8): 43.

OWEN, D.R., ALLERTON, C.M.N., ANDERSON, A.S., ..., WEI, L., YANG, Q. & ZHU, Y. (2021), An Oral SARS-CoV-2 Mpro Inhibitor Clinical Candidate for the Treatment of COVID-19. Science 374(6575): 1586-1593.

OWEN, R., ASHTON, R.E., FERRARO, F.V., PHILLIPS, B.E., SKIPPER, L. & FAGHY, M.A. (2023), Acute COVID-19, the Lived Experience, and Lessons to Learn for Future Pandemics. Disaster Medicine and Public Health Preparedness 17: e534.

PAINTER, G.R., NATCHUS, M.G., COHEN, O., HOLMAN, W. & PAINTER, W.P. (2021), Developing a Direct Acting, Orally Available Antiviral Agent in a Pandemic: The Evolution of Molnupiravir as a Potential Treatment for COVID-19. Current Opinion in Virology 50: 17-22.

PAPANERI, A.B., JOHNSON, R.F., WADA, J., BOLLINGER, L., JAHRLING, P.B. & KUHN, J.H. (2015), Middle East Respiratory Syndrome: Obstacles and Prospects for Vaccine Development. Expert Review of Vaccines 14(7): 949-962.

PARDI, N., HOGAN, M.J., PORTER, F.W. & WEISSMAN, D. (218), mRNA Vaccines – A New Era in Vaccinology. Nature Review Drug Discovery 17(4): 261-279.

PARK, J., KIM, D. & SONG, T.J. (2022), A Disproportionality Analysis for Association of Systemic Capillary Leak Syndrome with COVID-19 Vaccination Using the World Health Organization Pharmacovigilance Database. Vaccines (Basel) 10(6): 835.

PATONE, M., MEI, X.W., HANDUNNETTHI, L., ..., MILLS, N.L., SHEIKH, A. & HIPPISLEY-COX, J. (2022), Risks of Myocarditis, Pericarditis, and Cardiac Arrhythmias Associated with COVID-19 Vaccination or SARS-CoV-2 Infection. Nature Medicine 28(2): 410-422.

PERDIGUERO, B., MARCOS-VILLAR, L., LÓPEZ-BRAVO, M., ..., DEL VAL, M., ESTEBAN, M. & GÓMEZ, C.E. (2023), Immunogenicity and Efficacy of a Novel Multi-Patch SARS-CoV-2/COVID-19 Vaccine Candidate. Frontiers in Immunology 14: 1160065.

PÉREZ, P., ASTORGANO, D., ALBERICIO, G., ..., CASASNOVAS. J.M., ESTEBAN, M. & GARCÍA-ARRIAZA, J. (2022a), Intranasal Administration of a Single Dose of MVA-Based Vaccine Candidates against COVID-19 Induced Local and Systemic Immune Responses and Protects Mice from a Lethal SARS-CoV-2 Infection. Frontiers in Immunology 13: 995235.

PÉREZ, P., LÁZARO-FRÍAS, A., ZAMORA, C., ..., CASASNOVAS, J.M., ESTEBAN, M. & GARCÍA-ARRIAZA, J. (2022b), A Single Dose of an MVA Vaccine Expressing a Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spike Protein Neutralizes Variants of Concern and Protects Mice from a Lethal SARS-CoV-2 Infection. Frontiers in Immunology 12: 824728.

PERROTTA, C., FENIZIA, C., CARNOVALE, C., POZZI, M., TRABATTONI, D., CERVIA, D. & CLEMENTI, E. (2023), Updated Considerations for the Immunopharmacological Aspects of the «Talented mRNA Vaccines». Vaccines (Basel). 11(9): 1481.

PIECHOTTA, V., MELLINGHOFF, S.C., HIRSCH, C., ..., CORNELY, O.A., BRÖCKELMANN, P.J. & SKOETZ, N. (2022), Effectiveness, Immunogenicity, and Safety of COVID-19 Vaccines for Individuals with Hematological Malignancies: A Systematic Review. Blood Cancer Journal 12(5): 86.

PLANTE, J.A., MITCHELL, B.M., PLANTE, K.S., DEBBINK, K., WEAVER, S.C. & MENACHERY, V.D. (2021), The Variant Gambit: COVID-19's Next Move. Cell Host and Microbe. 29(4): 508-515.

PLOTKIN, S. (2004), History of Vaccination. Proceedings of the National Academy of Sciences 111(34): 12283-12287.

POLACK, F.P., THOMAS, S.J., KITCHIN, N., ..., JANSEN, K.U., GRUBER, W.C. & C4591001 Clinical Trial Group (2020), Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. New England Journal of Medicine 383(27): 2603-2615.

POLLARD, A.J. & BIJKER, E.M. (2021), A Guide to Vaccinology: From Basic Principles to New Developments. Nature Reviews Immunology 21(2): 83-100.

POZZETTO, B., LEGROS, V., DJEBALI, S., ..., MARVEL, J., WALZER, T. & TROUILLET-ASSANT, S. (2021), Immunogenicity and Efficacy of Heterologous ChAdOx1-BNT162b2 Vaccination. Nature 600(7890): 701-706.

PRIVOR-DUMM, L., EXCLER, J.L., GILBERT, S., ABDOOL KARIM, S.S., HOTEZ, P.J., THOMPSON, D. & KIM, J.H. (2023), Vaccine Access, Equity and Justice: COVID-19 Vaccines and Vaccination. BMJ Global Health 8(6): e011881.

PURCELL, L.A., PICCOLI, L., PIZZUTO, M.S., ..., SNELL, G., VEESLER, D. & CORTI, D. (2022), Broadly Neutralizing Antibodies Overcome SARS-CoV-2 Omicron Antigenic Shift. Nature. 602(7898): 664-670.

QUINTI, I., LOUGARIS, V., MILITO, C., ..., AGOSTINI, C., CARSETTI, R. & PLEBANI, A. (2020), A Possible Role for B Cells in COVID-19? Lesson from Patients with Agammaglobulinemia. Journal of Allergy and Clinical Immunology 146(1): 211-213.e4.

RAMASAMY, M.N., MINASSIAN, A.M., EWER, K.J., ..., FAUST, S.N., POLLARD, A.J. & OXFORD COVID Vaccine Trial Group (2021), Safety and Immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine Administered in a Prime-Boost Regimen in Young and Old Adults (COV002): A Single-Blind, Randomised, Controlled, Phase 2/3 Trial. The Lancet. 96(10267): 1979-1993.

REDDING, L. & WEINER, D.B. (2009), DNA Vaccines in Veterinary Use. Expert Review of Vaccines. 8(9): 1251-1276.

REIMER, J.M., KARLSSON, K.H., LÖVGREN-BENGTSSON, K., MAGNUSSON, S.E., FUENTES, A. & STERTMAN, L. (2012), Matrix-M™ Adjuvant Induces Local Recruitment, Activation and Maturation of Central Immune Cells in Absence of Antigen. PLoS One. 7(7): e41451.

RESSING, M.E., VAN GENT, M., GRAM, A.M., HOOYKAAS, M.J., PIERSMA, S.J. & WIERTZ, E.J. (2015), Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. Current Topics in Microbiology and Immunology 391: 355-381.

RIJKERS, G., MURK, J.L., WINTERMANS, B., ..., REUSKEN, C., VAN DER POL, P. & REIMERINK, J. (2020), Differences in Antibody Kinetics and Functionality between Severe and Mild Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 infections. Journal of Infectious Diseases 222(8): 1265-1269.

ROBBINS, J.B., SCHNEERSON, R., TROLLFORS, B., SATO, H., SATO, Y., RAPPUOLI, R. & KEITH, J.M. (2005), The Diphtheria and Pertussis Components of Diphtheria-Tetanus Toxoids-Pertussis Vaccine Should Be Genetically Inactivated Mutant Toxins. Journal of Infectious Diseases 191(1): 81-88.

ROBERTS, A., VOGEL, L., GUARNER, J., HAYES, N., MURPHY, B., ZAKI, S. & SUBBARAO, K. (2005), Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection of Golden Syrian Hamsters. Journal of Virology 79(1): 503-511.

ROH, J.S. & SOHN, D.H. (2018), Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. Immune Network 18(4): e27.

ROLLIER, C.S., REYES-SANDOVAL, A., COTTINGHAM, M.G., EWER, K. & HILL, A.V. (2011), Viral Vectors as Vaccine Platforms: Deployment in Sight. Current Opinion in Immunology 23(3): 377-382.

RUIZ-BRAVO, A. & AVILÉS, P.M. (2022), E.5.04. Procedimientos en microbiología y enfermedades infecciosas. En: Martín-Zúñiga JM y Orellana JM, editores. Ciencia y tecnología en la investigación animal. Madrid: Universidad de Alcalá y SECAL.

RUIZ-BRAVO, A. & JIMENEZ-VALERA, M. (2015), Vaccines. Pharm Policy Law 17: 191-212.

RUIZ-BRAVO, A. & JIMÉNEZ-VALERA, M. (2020), SARS-CoV-2 y pandemia de síndrome respiratorio agudo (COVID-19). Ars Pharmaceutica 61(2): 63-79.

RUSSELL, R.L., PELKA, P. & MARK, B.L. (2021), Frontrunners in the Race to Develop a SARS-CoV-2 Vaccine. Canadian Journal of Microbiology 67(3): 189-212.

SADOFF, J., GRAY, G., VANDEBOSCH, A., ..., STRUYF, F., DOUOGUIH, M. & ENSEMBLE Study Group (2021), Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26. COV2.S Vaccine against COVID-19. New England Journal of Medicine 384(23): 2187-2201.

SAHIN, U., MUIK, A., DERHOVANESSIAN, E., ..., DORMITZER, P.R., JANSEN, K.U. & TÜRECI, Ö. (2020), COVID-19 Vaccine BNT162b1 Elicits Human Antibody and TH1 T Cell Responses. Nature 586(7830): 594-599.

SAKSENA, N.K., REDDY, S.B., MIRANDA-SAKSENA, M., CARDOSO, T.H.S, SILVA. E.M.A., FERREIRA, J.C. & RABEH, W.M. (2023), SARS-CoV-2 Variants, Its Recombinants and Epigenomic Exploitation of Host Defences. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease 1869(8): 166836.

SANCHEZ-TRINCADO, J.L., GOMEZ-PEROSANZ, M. & RECHE, P.A. (2017), Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. Journal of Immunology Research 2017: 2680160.

SANDERS, R.W. & MOORE, J.P. (2021), Virus Vaccines: Proteins Prefer Prolines. Cell Host and Microbe. 29(3): 327-333.

SAPKOTA, B., SAUD, B., SHRESTHA, R., AL-FAHAD, D., SAH, R., SHRESTHA, S. & RODRIGUEZ-MORALES, A.J. (2022), Heterologous Prime-Boost Strategies for COVID-19 Vaccines. J Travel Med. 29(3):taab191.

SAUNDERS, K.O., LEE, E., PARKS, R., ..., MONTEFIORI, D.C., BARIC, R.S. & HAYNES, B.F. (2021), Neutralizing Antibody Vaccine for Pandemic and Pre-Emergent Coronaviruses. Nature 594(7864): 553-559.

SCHMIDT, T., KLEMIS, V., SCHUB, D., ..., GÄRTNER, B.C., SESTER, U. & SESTER, M. (2021), Immunogenicity and Reactogenicity of Heterologous ChAdOx1 nCoV-19/mRNA Vaccination. Nature Medicine 27(9): 1530-1535.

SCHULTZ, N.H., SØRVOLL, I.H., MICHELSEN, A.E., ..., SKATTØR, T.H., TJØNNFJORD, G.E. & HOLME, P.A. (2021), Thrombosis and Thrombocytopenia after ChAdOx1 nCoV-19 Vaccination. New England Journal of Medicine 384(22): 2124-2130.

SCHULZ, K.S. & MOSSMAN, K.L. (2016), Viral Evasion Strategies in Type I IFN Signaling – A Summary of Recent Developments. Front Immunol. 7: 498.

SETTE, A. & CROTTY, S. (2021), Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. Cell 184(4): 861-880.

SHAFAATI, M., SAIDIJAM, M., SOLEIMANI, M., ..., RAHBARIZADEH, F., SAMADI, P. & AHMADYOUSEFI, Y. (2022), A Brief Review on DNA Vaccines in the Era of COVID-19 17(1): 49-66.

SHAW, R.H., STUART, A., GREENLAND, M., LIU, X., NGUYEN VAN-TAM, J.S. & SNAPE, M.D. (2021), Com-COV Study Group. Heterologous Prime-Boost

COVID-19 Vaccination: Initial Reactogenicity Data. The Lancet. 397(10289): 2043-2046.

SHERWOOD, E.R., BURELBACH, K.R., MCBRIDE, M.A., ..., PATIL, N.K., WILLIAMS, D.L. & BOHANNON, J.K. (2022), Innate Immune Memory and the Host Response to Infection. Journal of Immunology 208(4): 785-792.

SHIMABUKURO, T.T., KIM, S.Y., MYERS, T.R., ..., MARTIN, S.W., GEE, J.M., MEANEY-DELMAN, D.M. & CDC (2021), v-Safe COVID-19 Pregnancy Registry Team. Preliminary Findings of mRNA COVID-19 Vaccine Safety in Pregnant Persons. New England Journal of Medicine 384(24): 2273-2282.

SHROFF, H., SATAPATHY, S.K., CRAWFORD, J.M., TODD, N.J. & VANWAGNER, L.B. (2022), Liver Injury Following SARS-CoV-2 Vaccination: A Multicenter Case Series. Journal of Hepatology 76(1): 211-214.

SIMONE, A., HERALD, J., CHEN, A., GULATI, N., SHEN, A.Y., LEWIN, B. & LEE, M.S. (2021), Acute Myocarditis Following COVID-19 mRNA Vaccination in Adults Aged 18 Years or Older. JAMA Intern Medicine181(12): 1668-1670.

SINGH, K., MEHTA, D., DUMKA, S., CHAUHAN, A.S. & KUMAR, S. (2023), Quasispecies Nature of RNA Viruses: Lessons from the Past. Vaccines (Basel) 11(2): 308.

SMITH, R., CHEN, K., WINNER, D., FRIEDHOFF, S. & WARDLE, C. (2023), A Systematic Review of COVID-19 Misinformation Interventions: Lessons Learned. Health Affairs (Millwood). 101377hlthaff202300717.

SMITS, N., RASMUSSEN, J., BODEA, G.O., ..., WATTERSON, D., EWING, A.D. & FAULKNER, G.J. (2021), No Evidence of Human Genome Integration of SARS-CoV-2 Found by Long-Read DNA Sequencing. Cell Reports 36(7): 109530.

SOLFOROSI, L., KUIPERS, H., JONGENEELEN, M., ..., SCHUITEMAKER, H., WEGMANN, F. & ZAHN, R.C. (2021), Immunogenicity and Efficacy of One and Two Doses of Ad26.COV2.S COVID Vaccine in Adult and Aged NHP. Journal of Experimental Medicine 218(7): e20202756.

SONOYAMA, T., KAMITANI, A., SHIBATA, R.Y., SEKI, N.M., OMOTO, S., IGARASHI, K. & ARIYASU, M. (2023), Safety and Immunogenicity of a Booster Dose of S-268019-b: Interim Findings of a Phase 3, Open-Label Clinical Study in Japan. Vaccine X. 15: 100390.

SUN, X., YI, C., ZHU, Y., ..., XU, J., XIE, Y. & SUN, B. (2022), Neutralization Mechanism of a Human Antibody with Pan-Coronavirus Reactivity Including SARS-CoV-2. Nature Microbiology 7(7): 1063-1074.

SUNDER, A., SAHA, S., KAMATH, S. & KUMAR, M. (2022), Vaccine-Induced Thrombosis and Thrombocytopenia (VITT); Exploring the Unknown. Journal of Family Medicine and Primary Care 11(5): 2231-2233.

TABARSI, P., ANJIDANI, N., SHAHPARI, R., ..., TAHERI, A., PETROVSKY, N. & BARATI, S. (2023), Evaluating the Efficacy and Safety of SpikoGen®, an Advax-CpG55.2-Adjuvanted Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein Vaccine: A Phase 3 Randomized Placebo-Controlled Trial. Clinical Microbiology and Infection 29(2): 215-220.

TAN, C.W., CHIA, W.N., QIN, X., ..., LYE, D.C., ANDERSON, D.E. & WANG, L.F. (2020), A SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test Based on Antibody-Mediated Blockage of ACE2-Spike Protein-Protein Interaction. Nature Biotechnology 38(9): 1073-1078.

TAN, A.T., LINSTER, M., TAN, C.W., ..., LYE, D., WANG, L.F. & BERTOLETTI, A. (2021), Early Induction of Functional SARS-CoV-2-Specific T Cells Associates with Rapid Viral Clearance and Mild Disease in COVID-19 Patients. Cell Reports 34(6): 108728.

TANG, D., KANG, R., COYNE, C.B., ZEH, H.J. & LOTZE, M.T. (2012), PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. Immunological Reviews 249(1): 158-175.

TANG, J., RAVICHANDRAN, S., LEE, Y., ..., GENSER, H., GOLDING, H. & KHURANA, S. (2021), Antibody Affinity Maturation and Plasma IgA Associate with Clinical Outcome in Hospitalized COVID-19 Patients. Nature Communications 12(1): 1221.

TARKE, A., COELHO, C.H., ZHANG, Z., ..., CROTTY, S., GRIFONI, A. & SETTE, A. (2022), SARS-CoV-2 Vaccination Induces Immunological T Cell Memory Able to Cross-Recognize Variants from Alpha to Omicron. Cell 185(5): 847-859.e11.

TARTOF, S.Y., SLEZAK, J.M., FISCHER, H., ..., ANGULO, F.J., JODAR, L. & MCLAUGHLIN, J.M. (2021), Effectiveness of mRNA BNT162b2 COVID-19 Vaccine up to 6 Months in a Large Integrated Health System in the USA: A Retrospective Cohort Study. The Lancet 398(10309): 1407-1416.

TARTOF, S.Y., SLEZAK, J.M., PUZNIAK, L., ..., VALLURI, S.R., JODAR, L. & MCLAUGHLIN, J.M. (2022), Durability of BNT162b2 Vaccine against Hospital and Emergency Department Admissions Due to the Omicron and Delta Variants in a Large Health System in the USA: A Test-Negative Case-Control Study. The Lancet Respiratory Medicine 10(7): 689-699.

TATSIS, N. & ERTL, H.C. (2004), Adenoviruses as Vaccine Vectors. Molecular Therapy 10(4): 616-629.

THIELE, T., ULM, L., HOLTFRETER, S., ..., SELLENG, K., HÜBNER, N.O. & GREINACHER, A. (2021), Frequency of Positive Anti-PF4/Polyanion Antibody Tests after COVID-19 Vaccination with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2. Blood 138(4): 299-303.

THIEME, C.J., ANFT, M., PANISKAKI, K., ..., STERVBO, U., ROCH, T. & BABEL, N. (2020), Robust T Cell Response toward Spike, Membrane, and Nucleocapsid SARS-CoV-2 Proteins Is Not Associated with Recovery in Critical COVID-19 Patients. Cell Reports Medicine 1(6): 100092.

THIMMIRAJU, S.R., ADHIKARI, R., VILLAR, M.J., ..., BOTTAZZI, M.E., HOTEZ, P.J. & POLLET, J. (2023), A Recombinant Protein XBB.1.5 RBD/Alum/CpG Vaccine Elicits High Neutralizing Antibody Titers against Omicron Subvariants of SARS-CoV-2. Vaccines (Basel) 11(10): 1557.

THOMAS, S.J., MOREIRA, E.D. JR, KITCHIN, N, ..., GRUBER, W.C., JANSEN, K.U. & C4591001 Clinical Trial Group (2021), Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. New England Journal of Medicine 385(19): 1761-1773.

THULUVA, S., PARADKAR, V., GUNNERI, S., ..., BASU, I., KUMAR, K.A.A. & PANDEY, A.K. (2023), Immunogenicity and Safety of Biological E's CORBEVAX™ Vaccine Compared to COVISHIELD™ (ChAdOx1 nCoV-19) Vaccine Studied in a Phase-3, Single Blind, Multicentre, Randomized Clinical Trial. Human Vaccines and Immunotherapeutics 19(1): 2203632.

TIAN, J.H., PATEL, N., HAUPT, R., ..., ELLINGSWORTH, L., GLENN, G. & SMITH, G. (2021), SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Vaccine Candidate NVX-CoV2373 Immunogenicity in Baboons and Protection in Mice. Nature Communications 12(1): 372.

TIBONI, M., CASETTARI, L. & LLUM, L. (2021), Nasal Vaccination against SARS-CoV-2: Synergistic or Alternative to Intramuscular Vaccines? International Journal of Pharmacetics 603: 120686.

TOOR, S.M., SALEH, R., SASIDHARAN NAIR, V., TAHA, R.Z. & ELKORD, E. (2021), T-Cell Responses and Therapies against SARS-CoV-2 Infection. Immunology. 162(1): 30-43.

TORALES, J., CUENCA-TORRES, O., BARRIOS, L., ..., CHEN, C., JANSSEN, R. & LIEN, C.E. (2023), An Evaluation of the Safety and Immunogenicity of MVC-COV1901: Results of an Interim Analysis of a Phase III, Parallel Group, Randomized, Double-Blind, Active-Controlled Immunobridging Study in Paraguay. Vaccines 41(1): 109-118.

ULLRICH, S., EKANAYAKE, K.B., OTTING, G. & NITSCHE, C. (2022), Main Protease Mutants of SARS-CoV-2 Variants Remain Susceptible to Nirmatrelvir. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 62: 128629.

USHER, A.D. (2022), CEPI Launches 100-Day Vaccine «Moonshot». The Lancet. 399(10330): 1107-1108.

URA, T., YAMASHITA, A., MIZUKI, N., OKUDA, K. & SHIMADA, M. (2021), New Vaccine Production Platforms Used in Developing SARS-CoV-2 Vaccine Candidates. Vaccine 39(2): 197-201.

VAN DIS, E., SOGI, K.M., RAE, C.S., ..., DUBENSKY, T.W. Jr, PORTNOY, D.A. & STANLEY, S.A. (2018), STING-Activating Adjuvants Elicit a Th17 Immune Response and Protect against *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Cell Reports 23(5): 1435-1447.

VAN DOREMALEN, N., LAMBE, T., SPENCER, A., ..., DE WIT, E., GILBERT, S.C. & MUNSTER, V.J. (2020), ChAdOx1 nCoV-19 Vaccine Prevents SARS-CoV-2 Pneumonia in Rhesus Macaques. Nature 586(7830): 578-582.

VAN DOREMALEN, N., PURUSHOTHAM, J.N., SCHULZ, J.E., ..., GILBERT, S.C., LAMBE, T. & MUNSTER, V.J. (2021), Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 Vaccination Reduces Viral Shedding after SARS-CoV-2 D614G Challenge in Preclinical Models. Science Translational Medicine 13(607): eabh0755.

VANDENBERG, O., MARTINY, D., ROCHAS, O., VAN BELKUM, A. & KOZLAKIDIS, Z. (2021), Considerations for Diagnostic COVID-19 Tests. Nature Reviews Microbiology 19(3): 171-183.

VARNAVSKI, A.N., YOUNG, P.R. & KHROMYKH, A.A. (2000), Stable High-Level Expression of Heterologous Genes In Vitro and In Vivo by Noncytopathic DNA-Based Kunjin Virus Replicon Vectors. Journal of Virology 74(9): 4394-4403.

VERMA, R., KHANNA, P. & CHAWLA, S. (2012), Influenza Vaccine: An Effective Preventive Vaccine for Developing Countries. Human Vaccines and Immunotherapy 8(5): 675-678.

VETTER, V., DENIZER, G., FRIEDLAND, L.R., KRISHNAN, J. & SHAPIRO, M. (2018), Understanding Modern-Day Vaccines: What You Need to Know. Annals of Medicine 50(2): 110-120.

VOGEL, A.B., KANEVSKY, I., CHE, Y., ..., DORMITZER, P.R., JANSEN, K.U. & SAHIN, U. (2021), BNT162b Vaccines Protect Rhesus Macaques from SARS-CoV-2. Nature 592(7853): 283-289.

VOLZ, A. & SUTTER, G. (2017), Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. Advances in Virus Research 97: 187-243.

VOYSEY, M., COSTA CLEMENS, S.A., MADHI, S.A., ..., GILBERT, S.C., POLLARD, A.J. & Oxforf COVID vaccine trial group (2021), Single-Dose Administration and the Influence of the Timing of the Booster Dose on Immunogenicity and Efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) Vaccine: A Pooled Analysis of Four Randomised Trials. The Lancet 397(10277): 881-891.

WAGNER, K.I., MATEYKA, L.M., JAROSCH, S., ..., GERHARD, M., D'IPPOLITO, E. & BUSCH, D.H. (2022), Recruitment of Highly Cytotoxic CD8+ T Cell

Receptors in Mild SARS-CoV-2 Infection. Cell Reports 38(2): 110214.

WALLACE, M., MOULIA, D., BLAIN, A.E., ..., LEE, G.M., DALEY, M.F. & OLIVER, S.E. (2022), The Advisory Committee on Immunization Practices' Recommendation for Use of Moderna COVID-19 Vaccine in Adults Aged ≥18 Years and Considerations for Extended Intervals for Administration of Primary Series Doses of mRNA COVID-19 Vaccines – United States, February 2022. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 71(11): 416-421.

WALLIS, J., SHENTON, D.P. & CARLISLE, R.C. (2019), Novel Approaches for the Design, Delivery and Administration of Vaccine Technologies. Clinical and Experimental Immunology 196(2): 189-204.

WALSH, E.E., FRENCK, R.W. JR, FALSEY, A.R., ..., JANSEN, K.U., ŞAHIN, U. & GRUBER, W.C. (2020), Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based COVID-19 Vaccine Candidates. New England Journal of Medicine 383(25): 2439-2450.

WANG, C.Y., PENG, W.J., KUO, B.S., ..., CHANG, P.Y., SHEN, Y.H. & HWANG, K.P. (2023a), Toward a Pan-SARS-CoV-2 Vaccine Targeting Conserved Epitopes on Spike and Non-Spike Proteins for Potent, Broad and Durable Immune Responses. PLoS Pathogens 19(4): e1010870.

WANG, G., ZHAO, K., HAN, J., ..., FU, Y., CUI, Y. & XIE, L. (2023b), Safety and Immunogenicity of a Bivalent SARS-CoV-2 Recombinant Protein Vaccine, SCTV01C in Unvaccinated Adults: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Phase I Clinical Trial. Journal of Infection 86(2): 154-225.

WANG, H., ZHANG, Y., HUANG, B., ..., GAO, G.F., TAN, W. & YANG, X. (2020), Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. Cell 182(3): 713-721.e9.

WANG, J., MAI, X., HE, Y., ZHU, C. & ZHOU, D. (2023c), IgG1-Dominant Antibody Response Induced by Recombinant Trimeric SARS-CoV-2 Spike Protein with PIKA Adjuvant. Vaccines (Basel) 11(4): 827.

WANG, M., WEN, W., ZHOU, M., WANG, C. & FENG, Z.H. (2022a), Meta-Analysis of Risk of Myocarditis after Messenger RNA COVID-19 Vaccine. American Journal of Cardiology 167: 155-157.

WANG, S., LIU, H., ZHANG, X. & QIAN, F. (2015), Intranasal and Oral Vaccination with Protein-Based Antigens: Advantages, Challenges and Formulation Strategies. Protein and Cell. 6(7): 480-503.

WANG, Z. & XU, J. (2020), Better Adjuvants for Better Vaccines: Progress in Adjuvant Delivery Systems, Modifications, and Adjuvant-Antigen Codelivery. Vaccines (Basel) 8(1): 128.

WANG, Z., ZHAO, Z., CUI, T., ..., XU, M., YANG, X. & HUANG, W. (20222b), Heterologous Boosting with Third Dose of Coronavirus Disease Recombinant Subunit Vaccine Increases Neutralizing Antibodies and T Cell Immunity against Different Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants. Emerging Microbes and Infections 11(1): 829-840.

WATANABE, Y., MENDONÇA, L., ALLEN, E.R., ..., ZHANG, P., GILBERT, S.C. & CRISPIN, M. (2021), Native-Like SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Expressed by ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 Vaccine. ACS Cent Science 7(4): 594-602.

WELI, S.C. & TRYLAND, M. (2011), Avipoxviruses: Infection Biology and Their Use as Vaccine Vectors. Virology Journal 8: 49.

WESSELHOEFT, R.A, KOWALSKI, P.S. & ANDERSON, D.G. (2018), Engineering Circular RNA for Potent and Stable Translation in Eukaryotic Cells. Nature Communications 9(1): 2629.

WU, F., ZHAO, S., YU, B., ..., XU, L., HOLMES, E.C. & ZHANG, Y.Z. (2020), A New Coronavirus Associated with Human Respiratory Disease in China. Nature 579(7798): 265-269.

WU, S., HUANG, J., ZHANG, Z., WU, J, ..., WANG, X., HOU, L. & CHEN, W. (2021), Safety, Tolerability, and Immunogenicity of an Aerosolised Adenovirus Type-5 Vector-Based COVID-19 Vaccine (Ad5-nCoV) in Adults: Preliminary Report of an Open-Label and Randomised Phase 1 Clinical Trial. The Lancet Infectious Disease 21(12): 1654-1664.

XIA, S., DUAN, K., ZHANG, Y., ..., GUO, W., LIU, J. & YANG, X. (2022), Safety and Immunogenicity of an Inactivated COVID-19 Vaccine, WIBP-CorV, in Healthy Children: Interim Analysis of a Randomized, Double-Blind, Controlled, Phase 1/2 Trial. Frontiers in Immunology 13: 898151.

XIA, S., DUAN, K., ZHANG, Y., ..., SHEN, S., GUO, W. & YANG, X. (2020), Effect of an Inactivated Vaccine against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. JAMA 324(10): 951-960.

XIA, S., ZHANG, Y., WANG, Y., ..., LIU, P., GUO, W. & YANG, X. (2021), Safety and Immunogenicity of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine, BBIBP-CorV: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1/2 Trial. The Lancet Infectious Diseases 21(1): 39-51.

XIONG, X., QU, K., CIAZYNSKA, K.A, ..., GOODFELLOW, I., DOFFINGER, R. & BRIGGS, J.A.G. (2020), A Thermostable, Closed SARS-CoV-2 Spike Protein Trimer. Nature Structural and Molecular Biology 27(10): 934-941.

YADAV, P.D., ELLA, R., KUMAR, S., ..., ABRAHAM, P., PANDA, S. & BHARGAVA, B. (2021), Immunogenicity and Protective Efficacy of Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine Candidate, BBV152 in Rhesus Macaques. Nature Communications 12(1): 1386.

YAN, B., CHAKRAVORTY, S., MIRABELLI, C., ..., WOBUS, C.E., AFZALI, B. & KAZEMIAN, M. (2021), Host-Virus Chimeric Events in SARS-CoV-2-Infected Cells Are Infrequent and Artifactual. Journal of Virology 95(15).

YANG, S., LI, Y., DAI, L., ..., HU, Z., GAO, L. & GAO, G.F. (2021), Safety and Immunogenicity of a Recombinant Tandem-Repeat Dimeric RBD-Based Protein Subunit Vaccine (ZF2001) against COVID-19 in Adults: Two Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1 and 2 Trials. The Lancet Infectious Diseases 21(8): 1107-1119.

YANG, Y., DUFAULT-THOMPSON, K., SALGADO FONTENELE, R. & JIANG, X. (2022), Putative Host-Derived Insertions in the Genomes of Circulating SARS-CoV-2 Variants. mSystems 7(3): e0017922.

YIN, Y., LIU, X.Z., HE, X. & ZHOU, L.Q. (2021), Exogenous Coronavirus Interacts with Endogenous Retrotransposon in Human Cells. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 11: 609160.

ZENG, W., MA, H., DING, C., ..., XIANG, Y., GAO, Y. & JIN, T. (2021), Characterization of SARS-CoV-2-Specific Antibodies in COVID-19 Patients Reveals Highly Potent Neutralizing IgA. Signal Transduction and Target Therapy 6(1): 35.

ZHANG, B.Z., HU, Y.F., CHEN, L.L., ..., TO, K.K., YUEN, K.Y. & HUANG, J.D. (2020), Mining of Epitopes on Spike Protein of SARS-CoV-2 from COVID-19 Patients. Cell Research 30(8): 702-704.

ZHANG, L., RICHARDS, A., BARRASA, M.I., HUGHES, S.H., YOUNG, R.A. & JAENISCH, R. (2021a), Reverse-Transcribed SARS-CoV-2 RNA Can Integrate into the Genome of Cultured Human Cells and Can Be Expressed in Patient-Derived Tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences 118(21): e2105968118.

ZHANG, Y., ZENG, G., PAN, H., ..., WANG, X., GAO, Q. & ZHU, F. (2021b), Safety, Tolerability, and Immunogenicity of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Healthy Adults Aged 18-59 Years: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1/2 Clinical Trial. The Lancet Infectious Diseases 21(2): 181-192.

ZHAO, H., LU, L., PENG, Z., ..., CHEN, H., YUEN, K.Y. & TO, K.K. (2022), SARS-CoV-2 Omicron Variant Shows Less Efficient Replication and Fusion Activity When Compared with Delta Variant in TMPRSS2-Expressed Cells. Emerging Microbes and Infection 11(1): 277-283.

ZHOU, Y., YUAN, S., TO, K.K., ..., LI, Y.F., CHAN, J.F. & SUN, H. (2022), Multiplex Metal-Detection Based Assay (MMDA) for COVID-19 Diagnosis and Identification of Disease Severity Biomarkers. Chemical Science 13(11): 3216-3226.

ZHU, F., JIN, P., ZHU, T., ..., WU, H., WANG, X. & CHEN, W. (2021), Safety and Immunogenicity of a Recombinant Adenovirus Type-5-Vectored COVID-19 Vaccine with a Homologous Prime-Boost Regimen in Healthy Participants Aged 6 Years and Above: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2b Trial. Clinical Infection Diseases 75(1): e783-e791.

ZHU, F.C., GUAN, X.H., LI, Y.H., ..., WANG, X.W., WANG, X.H. & CHEN, W. (2020a), Immunogenicity and Safety of a Recombinant Adenovirus Type-5-Vectored COVID-19 Vaccine in Healthy Adults Aged 18 Years or Older: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2 Trial. The Lancet 96(10249): 479-488.

ZHU, F.C., LI, Y.H., GUAN, X.H., ..., WANG, X.W., WANG, W. & CHEN, W. (2020b), Safety, Tolerability, and Immunogenicity of a Recombinant Adenovirus Type-5 Vectored COVID-19 Vaccine: A Dose-Escalation, Open-Label, Non-Randomised, First-In-Human Trial. The Lancet 395(10240): 1845-1854.

Capítulo XXVII

Tratamiento antiviral de COVID-19. Un desafío desde el punto de vista del descubrimiento de fármacos

José Carlos Menéndez
Unidad de Química Orgánica y Farmacéutica, Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense
y académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia (IdE)

INTRODUCCIÓN

A pesar de la demostrada eficacia de las vacunas como medio de prevención contra las enfermedades víricas es también de gran importancia la existencia de tratamientos farmacológicos que se puedan emplear en caso de haber contraído la enfermedad. Un ejemplo muy claro es el caso del SIDA, que ha podido transformarse de una enfermedad mortal en una crónica gracias a los avances en fármacos antivirales, incluso en ausencia de vacunas.

En el caso concreto de COVID-19, el tratamiento farmacológico es complementario de la vacunación y su desarrollo es importante por varios motivos:

1. Las vacunas conocidas no presentan un 100 % de efectividad, por lo que no previenen completamente la transmisión de la enfermedad.
2. La vacunación universal se enfrenta a notables obstáculos logísticos, especialmente en los países poco desarrollados.
3. Existen muchos casos de pacientes que desarrollan la enfermedad pese a haber sido vacunados, y es necesario tratarlos.
4. La administración de un tratamiento farmacológico debería conducir a síntomas más benignos, lográndose reducir la morbilidad y mortalidad y haciendo menos probable la saturación de los sistemas sanitarios por pacientes de COVID-19.
5. Afecciones persistentes como el COVID de larga duración requieren tratamiento farmacológico.
6. Los tratamientos farmacológicos pueden diseñarse para modular varias dianas terapéuticas que estén altamente conservadas entre variantes del virus o dianas del hospedador, por lo que potencialmente pueden conseguir actividad contra todas las variantes del virus.

Por tanto, los avances logrados en las vacunas contra la COVID-19 no implican que se dejen de investigar nuevos tratamientos de la enfermedad, ya que ambas estrategias son complementarias.

Para lograr una máxima eficacia, el tratamiento de COVID-19 debe ajustarse a las características peculiares de esta enfermedad (fig. 1). Tras la infección vírica, las etapas iniciales transcurren con síntomas leves (fiebre, dolores musculares, tos seca). Sin embargo, si la enfermedad avanza se entra en una segunda fase con síntomas pulmonares tales como falta de aliento e hipoxia. Aunque la carga vírica va disminuyendo progresivamente, en algunos pacientes los síntomas se agravan a causa de su propia respuesta inflamatoria. De hecho, los casos más graves de COVID-19 se deben a una respuesta inflamatoria sistémica asociada a un síndrome de liberación de citoquinas (SLC), también descrita como «tormenta de citoquinas», que transcurre con la liberación masiva de citoquinas proinflamatorias. Como consecuencia, existen dos abordajes terapéuticos posibles para la enfermedad, terapia antiviral y terapia antiinflamatoria, que tendrán mayores posibilidades de éxito si se aplican en la etapa adecuada, ya que uso de fármacos antivirales puede ser ineficaz si se administran cuando la tormenta de citoquinas está ya iniciada y análogamente la terapia antiinflamatoria no es útil en las fases iniciales. Este capítulo se centrará en el primero de estos aspectos, la terapia antiviral.

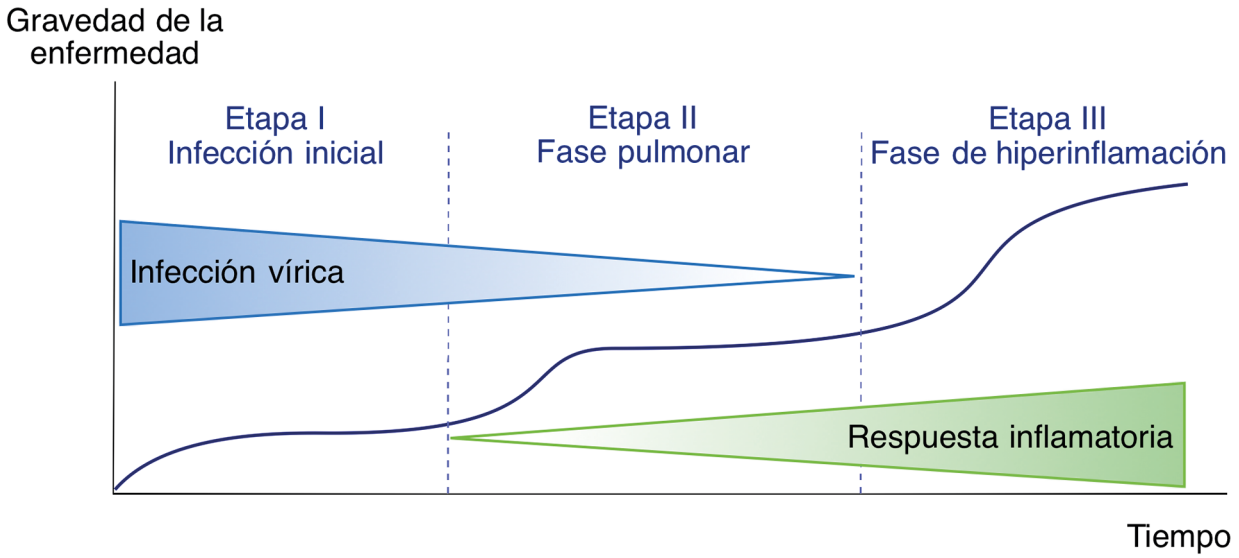


Figura 1. COVID-19: Etapas de la enfermedad. Adaptada a partir de la referencia (Siddiqi y Mehar 2020)

1. TRATAMIENTO DE COVID-19 Y REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS

El proceso tradicional de descubrimiento de fármacos *de novo* (fig. 2) es sumamente complejo y requiere en torno a 15 años para llevar un compuesto desde la fase de investigación inicial hasta el mercado. A la vista de la urgencia de encontrar tratamientos contra COVID-19, por el momento la mayor parte de los esfuerzos se han centrado en la estrategia alternativa conocida como reposicionamiento, que supone la utilización de un fármaco ya conocido para una aplicación diferente de la prevista inicialmente. Debido a que muchos de los estudios necesarios para la aprobación final del fármaco ya han sido realizados, esta estrategia permite acortar drásticamente los tiempos del proceso de desarrollo de fármacos (fig. 3).

Una última observación relativa a COVID-19 es que la experiencia indica que se trata de una enfermedad muy heterogénea, por lo cual solo los ensayos clínicos con un número elevado de pacientes dan información fiable. Esta observación pone en duda muchos de los ensayos clínicos realizados, en particular durante las fases iniciales de la epidemia, que no cumplen este requisito.

2. ESTRUCTURA DEL VIRUS

El agente responsable de COVID-19 es SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), un virus de ARN monocatenario en sentido positivo perteneciente a la familia *Coronaviridae*. Su genoma se compone de unos treinta mil nucleótidos y contiene cuatro genes que codifican para las proteínas estructurales características de los coronavirus:

1. Glicoproteína S, que existe en forma de un homotrímero que da lugar a las espículas características de la superficie del virus. Además, actuando como una proteína de fusión, permite la entrada del virus en la célula hospedadora.
2. Proteína E, que forma la envoltura el virus.
3. Proteína M, que forma la matriz que conecta la envoltura con el núcleo vírico.
4. Fosfoproteína N de la nucleocápside, que contiene el genoma del virus.
5. Además, también incluye codificación para los marcos abiertos de lectura que codifican proteínas no estructurales, entre ellas las enzimas necesarias para completar el ciclo reproductivo intracelular del virus.

La estructura del virus y la de su proteína más característica, la glicoproteína S, se esquematizan en la figura 4.

3. EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN VIRAL Y LAS PRINCIPALES DIANAS TERAPÉUTICAS POTENCIALES ASOCIADAS

El ciclo de multiplicación celular del virus SARS-CoV2 se resume en la figura 5 y puede resumirse en los siguientes puntos:

1. La glicoproteína S de la envoltura del virus interacciona con su receptor celular, la enzima conversora de angiotensina (ACE2), lo que desencadena el proceso de entrada del virus por endocitosis.
2. El endosoma que contiene la partícula vírica se fusiona con un lisosoma, lo que causa una reducción del pH que promueve la fusión de la membrana del

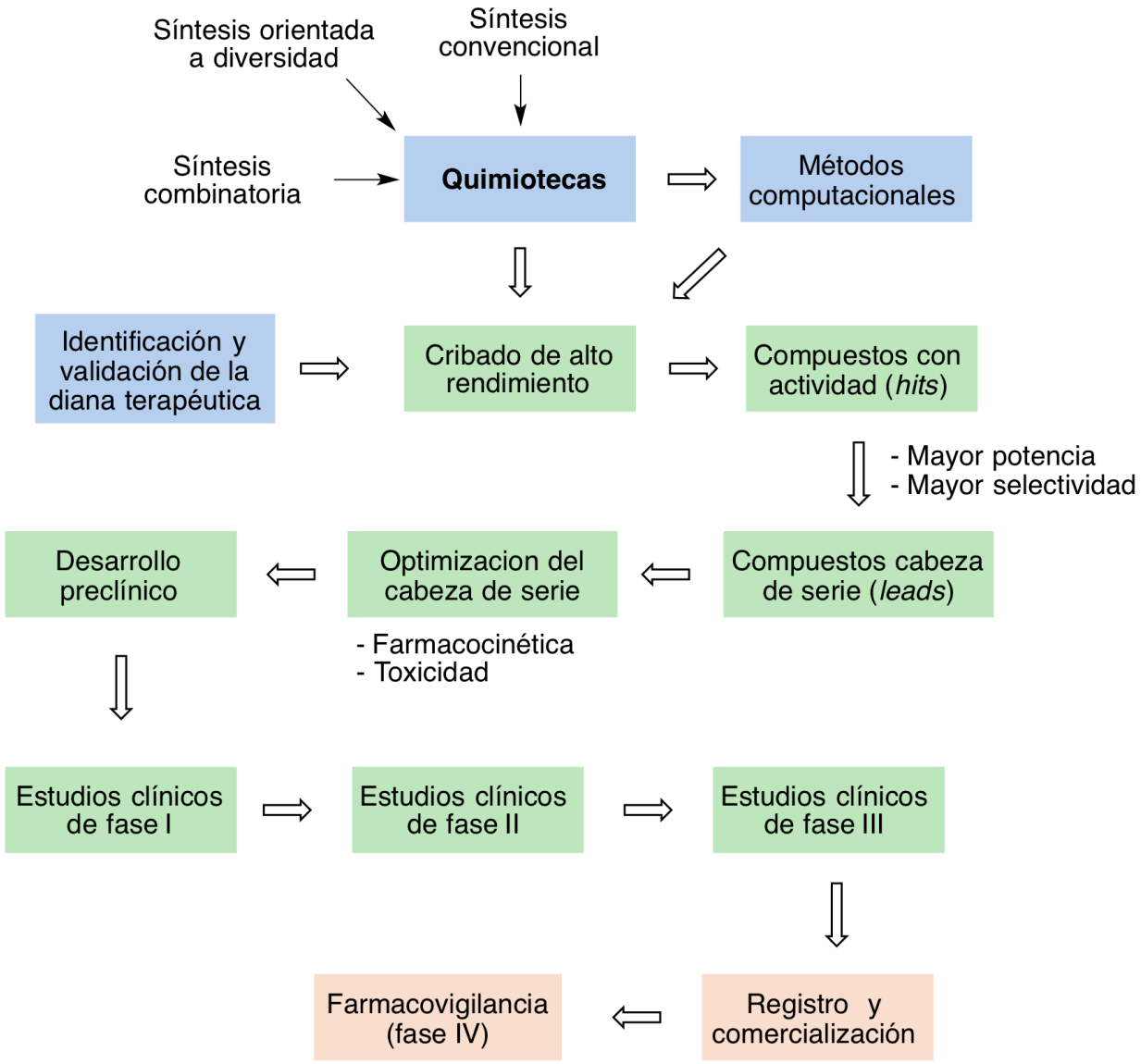


Figura 2. Etapas del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos

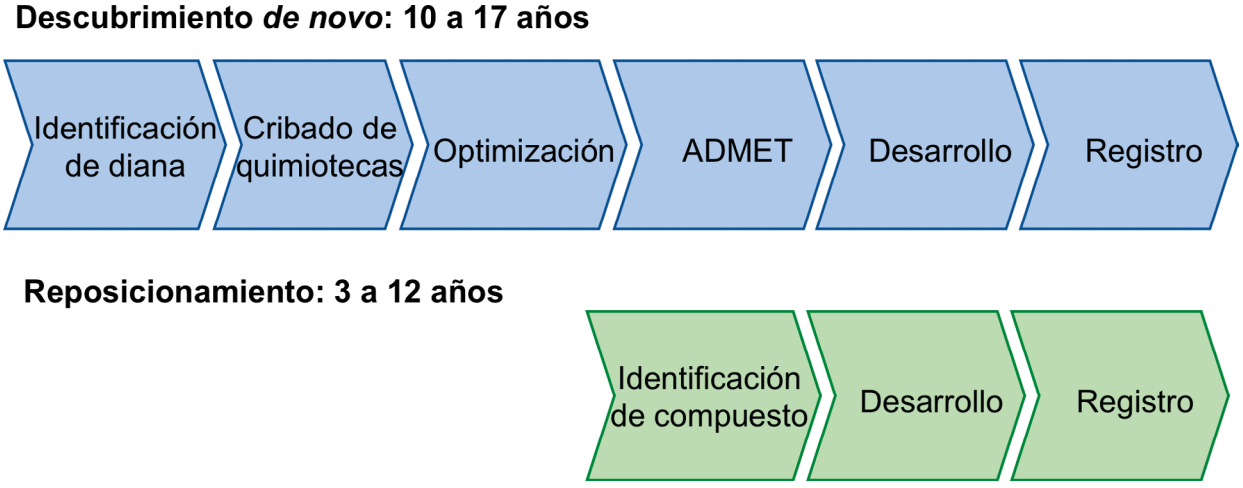


Figura 3. La estrategia de reposicionamiento de fármacos

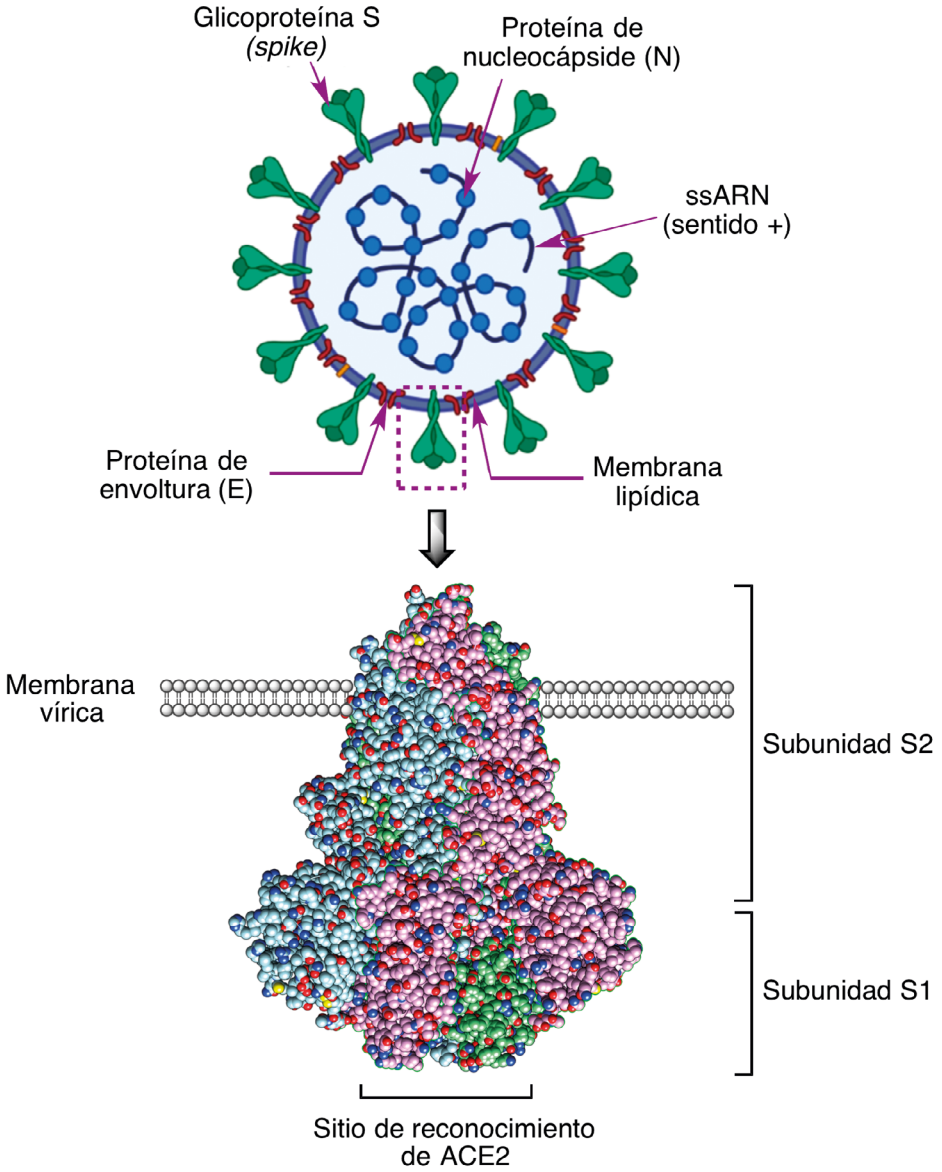


Figura 4. Estructura del virus SARS-CoV2 y de su glicoproteína S, la cual se generó a partir de PDB 6VXX (Protein Data Bank)

endosoma con la envoltura del virus. Como consecuencia, se libera la nucleocápside del virus en el citoplasma de la célula hospedadora.

3. Proteasas celulares de la célula invadida degradan la cápside, liberando el ARN del virus en el citoplasma.
4. Debido a que este ARN es de sentido positivo, puede ser traducido directamente por los ribosomas de la célula huésped. Como consecuencia, los procesos de síntesis proteica de dicha célula llevan a cabo la síntesis de proteínas víricas, en forma de poliproteínas.
5. Estas poliproteínas son procesadas por proteasas víricas, formando el complejo de replicación y transcripción.
6. A continuación, se sintetiza la hebra complementaria de ARN pre-genómico de sentido negativo que servirá posteriormente como molde para replicar el genoma viral. Además, el complejo de replicación y transcripción dará lugar a una serie de ARN subgenómicos de sentido positivo, cuya traducción generará posteriormente las proteínas virales.
7. En el retículo endoplasmático tiene lugar el ensamblaje de los componentes del virus. Su envoltura proviene de un fragmento de la membrana del retículo endoplasmático.
8. La partícula viral viaja hasta la superficie de la célula, utilizando el sistema celular de transporte de vesículas en el que interviene el aparato de Golgi.
9. Una última fase de maduración, en la que intervienen proteasas virales, hace que la partícula sea infecciosa y capaz comenzar un nuevo ciclo celular. Esta partícula viral sale de la célula por exocitosis.

Las proteínas involucradas en todas estas etapas son dianas potenciales en el descubrimiento de fármacos

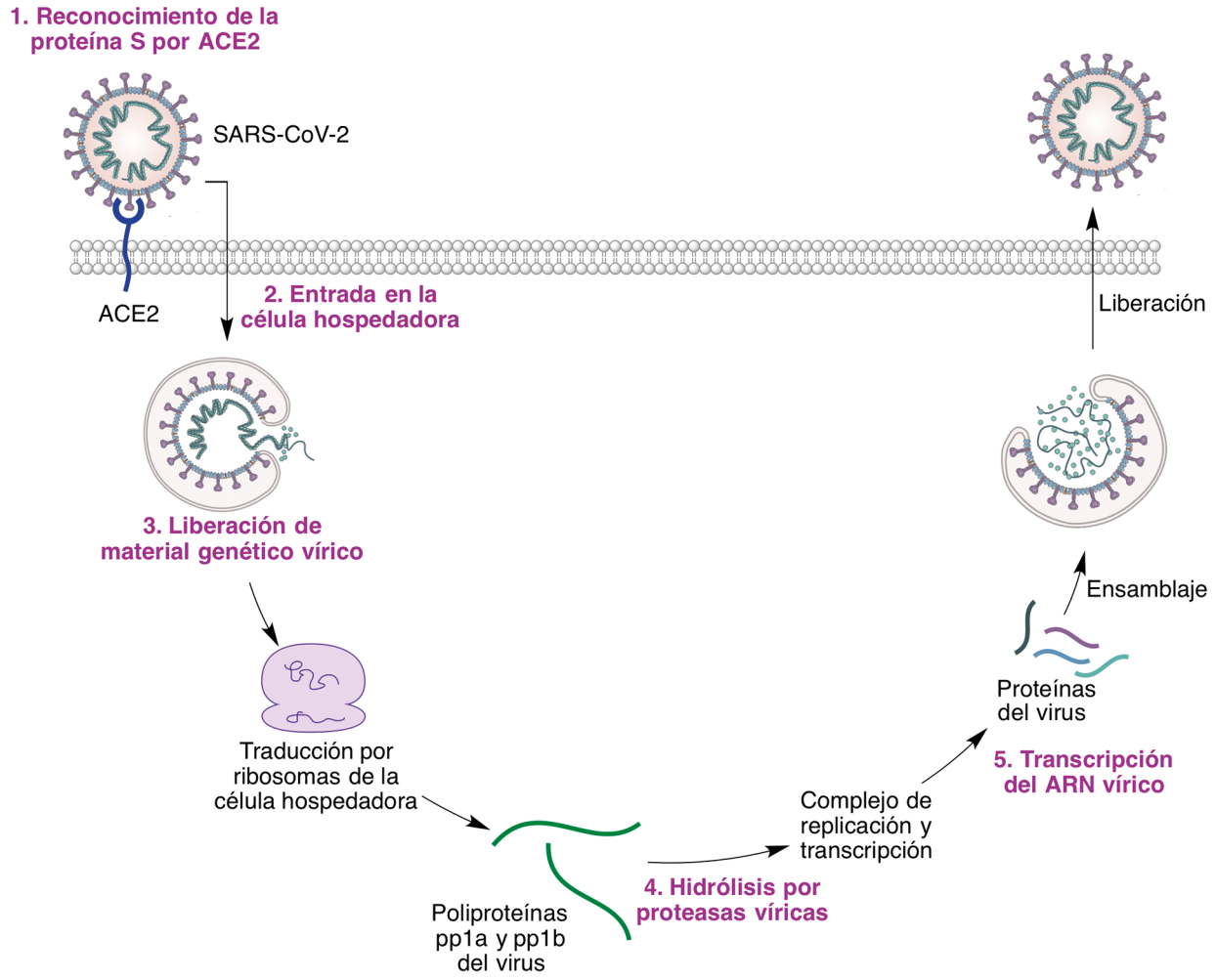


Figura 5. Esquema del ciclo de multiplicación celular del virus SARS-CoV-2, destacándose en negrita los procesos en los que interfieren los fármacos mencionados aquí

contra la enfermedad (Gil *et al.* 2020; Ghosh *et al.* 2020; Xu *et al.* 2021; Tarighi *et al.* 2021; Esposito *et al.* 2022; Menéndez 2022; Lei *et al.* 2022; NIH 2023).

4. FÁRMACOS QUE INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA S

4.1. El reconocimiento de ACE-2 por la proteína S como diana terapéutica

El virus SARS-CoV-2 reconoce la enzima conversora de angiotensina humana 2 (ACE2), que actúa como su receptor principal. Este reconocimiento tiene lugar a través del dominio de reconocimiento de la proteína S (*spike receptor-binding domain*, S-RBD) e inicia el proceso de entrada a la célula. Por tanto, la interferencia en la interacción entre ambas proteínas puede ser una aproximación útil al tratamiento de COVID-19.

El ecto-dominio soluble de la proteína ACE2 puede actuar como un señuelo, atrayendo a las partículas víricas e impidiendo que se unan a los receptores celulares. Por este motivo, la proteína ACE2 recombinante se ha estudiado en ensayos clínicos de fase I y II, estableciéndose una buena seguridad y tolerancia. Similarmente, una forma recombinante soluble de la proteína ACE2 humana, llamada APN01, de Apeiron Biologics, ha concluido ensayos clínicos de fase II en varios países, habiéndose demostrado la posibilidad de administrarla en forma de aerosol (Shoemaker *et al.* 2022). Una forma de progresar en esta estrategia es el diseño de proteínas ACE2 mutantes dotadas de una afinidad incrementada por el dominio de reconocimiento de la proteína S. Ejemplos de mutaciones de ACE2 que conducen a una afinidad incrementada son S19W y N330Y, representándose en la figura 6 la interacción de una proteína ACE2 así mutada con la proteína S de SARS-CoV2 (Ye *et al.* 2021).

El unifenovir (arbidol) es un antiviral de amplio espectro que se desarrolló en la década de 1970 en la Unión Soviética y se utiliza como antigripal en Rusia y China. Se ha demostrado también su actividad contra SARS-CoV-2,

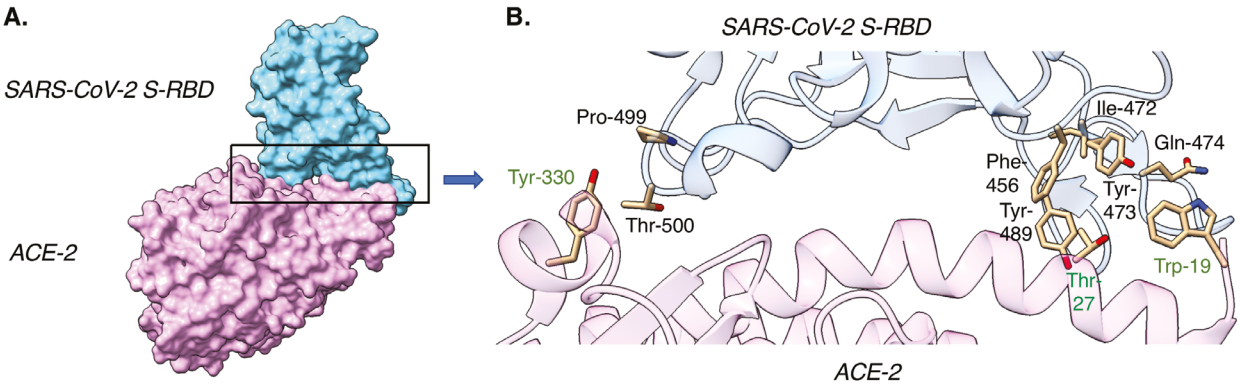


Figura 6. A, Complejo formado por la enzima conversora de una angiotensina humana 2 (ACE2) con la mutación S19W/N330Y y el dominio de reconocimiento de la proteína S (PDB 7EFP). B, Detalle de la interacción entre ambas proteínas

que, entre otros mecanismos, se debe a su capacidad de inhibir la interacción entre la proteína S viral y la proteína ACE-2, ya que se une al dominio de reconocimiento de esta última (Schuster *et al.* 2021).

4.2. Fármacos que interaccionan con la proteína S

Un primer mecanismo antiviral relacionado con el proceso de entrada del virus se basa en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína S (fig. 7), que están siendo aprobados a una velocidad poco habitual para el tratamiento de la enfermedad. Durante la primera ola de la enfermedad, se ensayaron también anticuerpos de pacientes convalecientes.

Entre los principales anticuerpos utilizados figuran moléculas de varias empresas farmacéuticas, entre ellas: (a) Eli Lilly, que ha desarrollado el bamlanivimab (LY-CoV555), etesevimab (LY-CoV016 o JS016) y bebtelovimab; (b) Regeneron, con el casirivimab (REGN10933) e imdevimab (REGN10987), cuya combinación se ha comercializado como REGEN-COV®; (c) AstraZeneca, con el cilgavimab (COV2-2130, AZD1061) y el tixagevimab (COV2-2196 o AZD8955), cuya combinación se ha comercializado como Evusheld®; (d) GSK y Vir Biotechnology, que han comercializado el sotrovimab (VIR-7831, Xevudy®); (e) Celltrion, que ha desarrollado el regdanvimab (CT-P59, Regkirona®). Muchos otros anticuerpos están en ensayos clínicos de fase III (Kumar *et al.* 2021). Sin embargo, estos anticuerpos demostraron ser ineficaces contra la variante Ómicron del virus por lo que actualmente su uso no está recomendado.

Además del uso terapéutico de los anticuerpos, cabe destacar que tanto la FDA como la EMA aprobaron la combinación cilgavimab/tixagevimab (Evusheld®) para la prevención y tratamiento de COVID-19 en adolescentes y adultos. Sin embargo, a principios de 2023 la FDA informó de que no es efectiva en la subvariante XBB.1.5 de la variante Ómicron del virus, lo que llevó posteriormente a retirar la autorización de emergencia para su comercialización (FDA 2023).

El empleo de estos anticuerpos lleva a una situación un tanto paradójica, ya que su indicación principal es el tratamiento de las etapas iniciales de la enfermedad, pero el hecho de que necesiten administración intravenosa obliga a un internamiento hospitalario. Por ese motivo, se está investigando actualmente la administración intramuscular o subcutánea de los anticuerpos. Otros problemas asociados al empleo de anticuerpos son su elevado coste y su incapacidad de actuar sobre todas las variantes del virus (Liu *et al.* 2021).

5. INHIBIDORES DE TMPRSS

Tras el reconocimiento por ACE-2 actúa sobre la proteína S una proteasa de serina conocida como TMPRSS (transmembrane serine protease 2), que la recorta en dos sitios, permitiendo la fusión de las dos membranas y la endocitosis del virus (fig. 8). Otra proteína implicada en la hidrólisis de la proteína S es la furina, que no se considera una buena diana terapéutica a causa de sus numerosas funciones fisiológicas (Rahbar Saadat *et al.* 2021).

Durante la primera ola de la enfermedad se ensayó contra COVID-19 el nafamostat, un inhibidor de TMPRSS2 desarrollado por Katsura Chemical Co. (Jang y Rhee 2020). Su análogo estructural camostat (Folpan®), que se ha utilizado durante mucho tiempo en Japón para el tratamiento de la pancreatitis crónica, es otro inhibidor de TMPRSS2 que se ha ensayado en fase I y II contra COVID-19, solo o en combinación, aunque no mejoró los resultados del placebo en cuanto a tiempo de hospitalización o gravedad de la enfermedad (Gunst *et al.* 2021). Hay otros ensayos clínicos en marcha que pueden dar informacion adicional sobre la utilidad real de

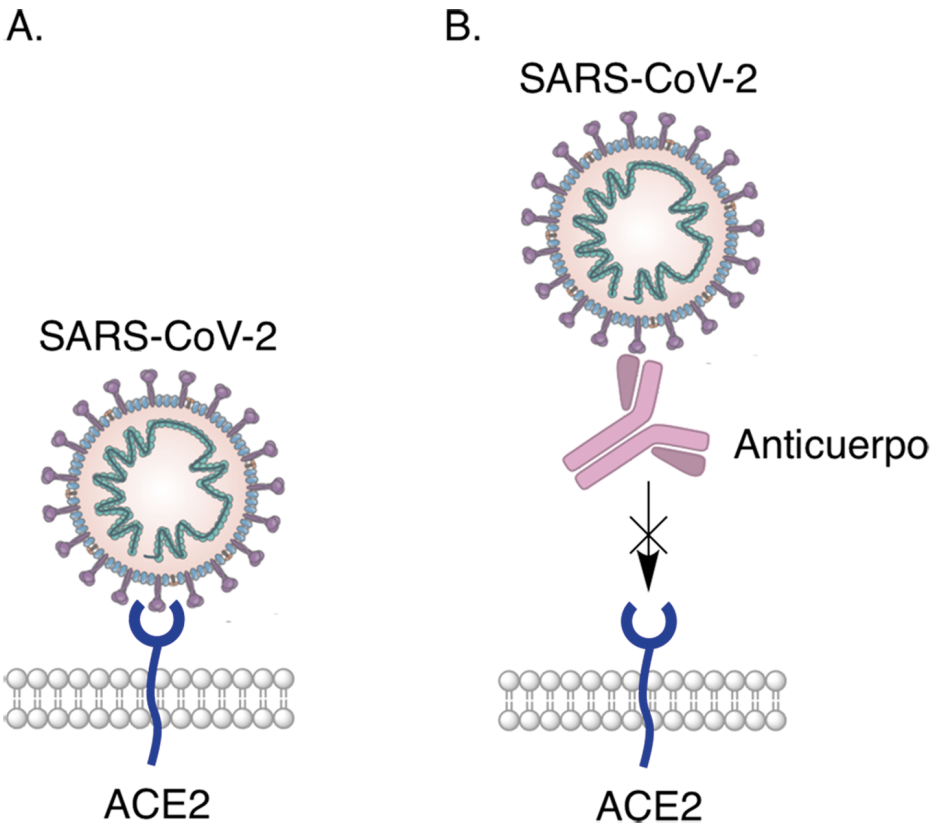


Figura 7. A, Reconocimiento de la proteína S de SARS-CoV2 por la proteína ACE2. B, Inhibición de dicho reconocimiento por un anticuerpo contra la proteína S

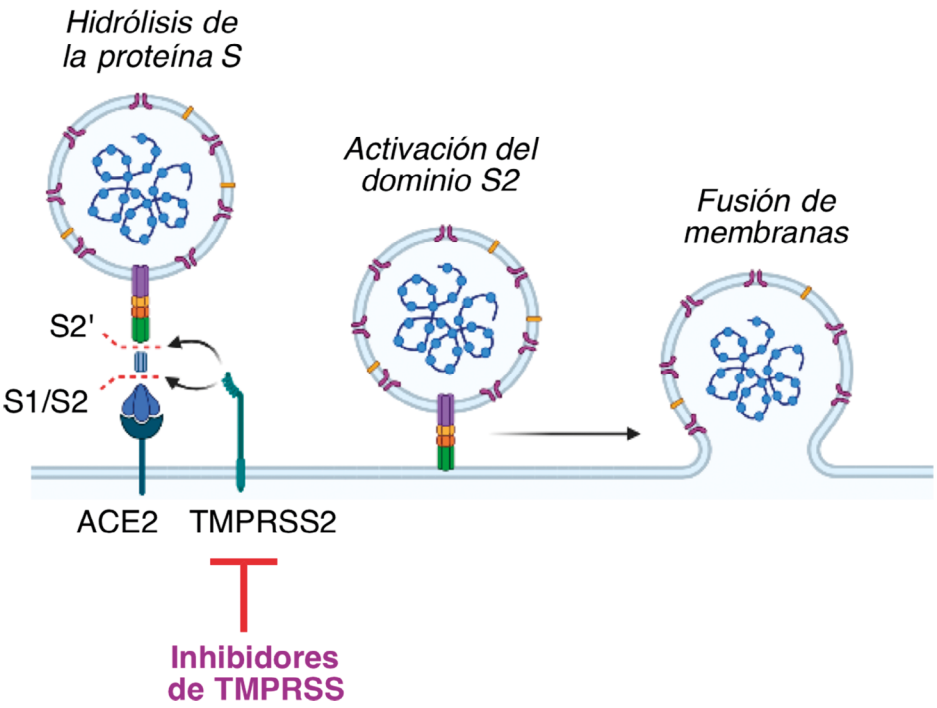


Figura 8. El proceso de entrada del virus SARS-CoV 2 a la célula hospedadora y algunos fármacos que lo inhiben

este compuesto. El upamostat (RHB-107, Mesupron®), de Red Hill BioPharma, es otro inhibidor de proteasas de serina que presenta actividad por vía oral y se está investigando para su uso contra COVID-19 (Plasse *et al.* 2023) (fig. 9).

Tanto el namadostat como el camostat son inhibidores irreversibles de TRPMSS. El reconocimiento de estos compuestos por parte de la enzima implica la interacción entre el fragmento de guanidinio de los fármacos y los residuos Asp-435 y Ser-436. Como es habitual en las

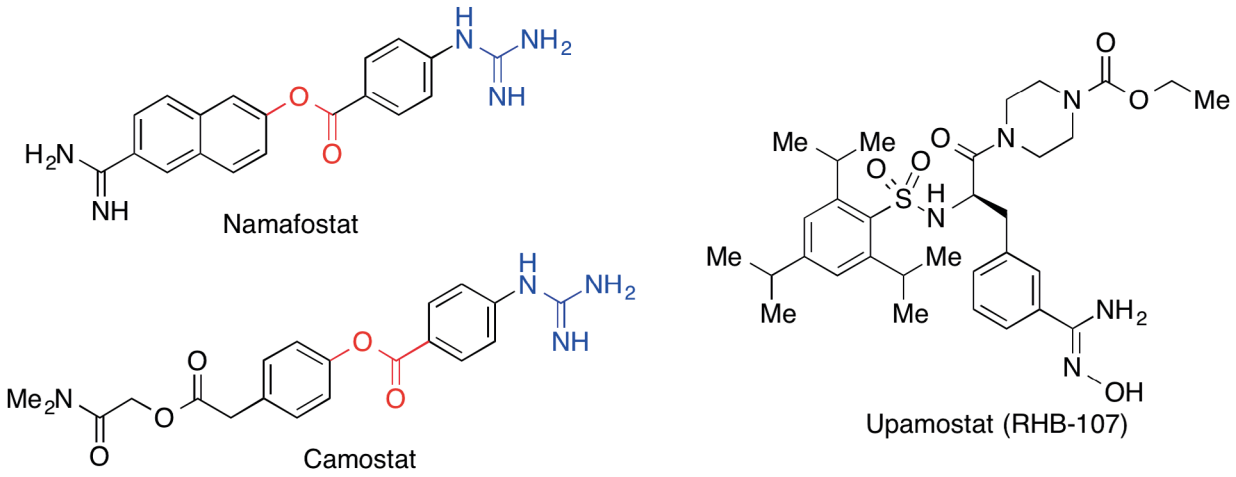


Figura 9. Inhibidores de la TRPMSS humana

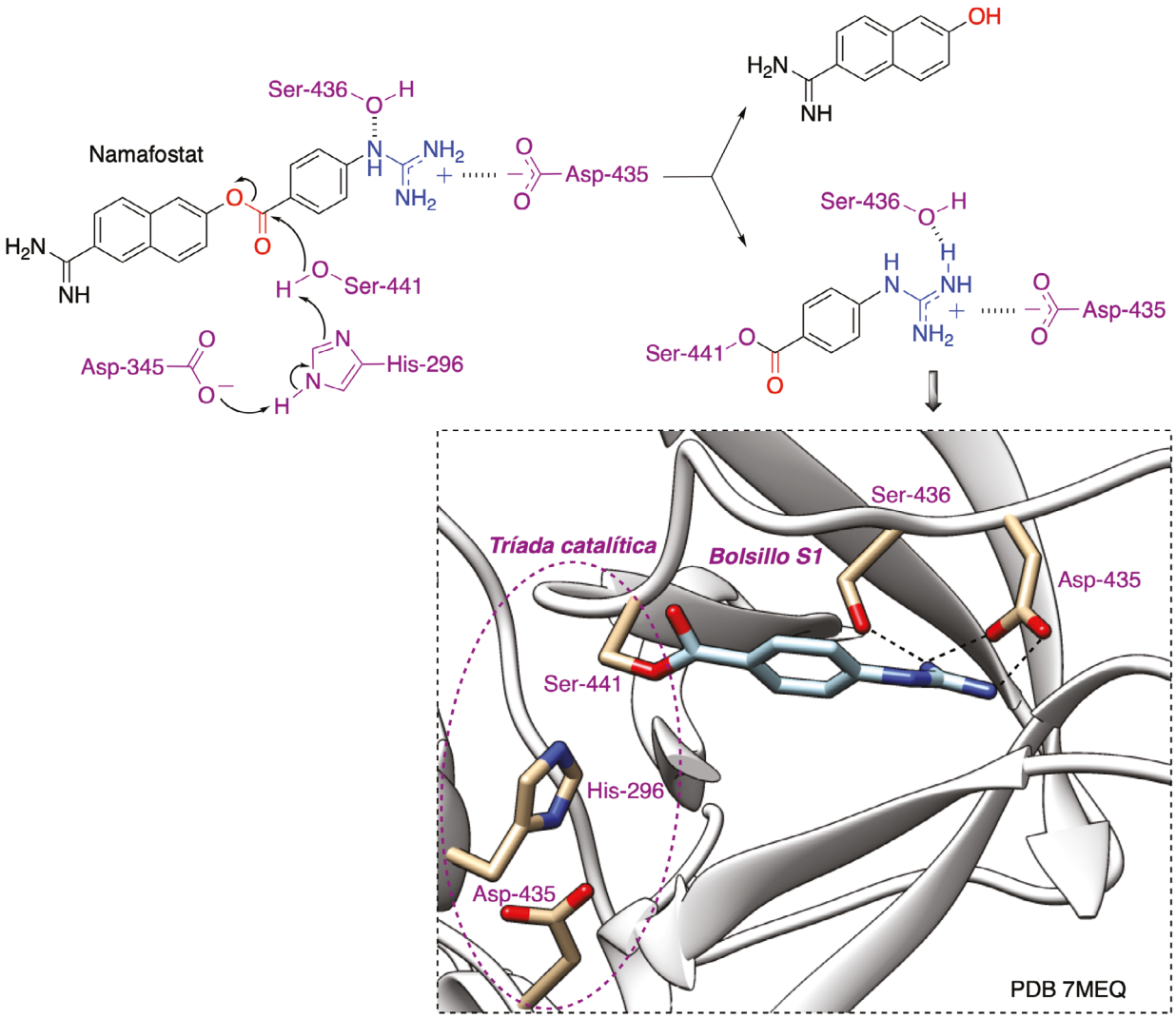


Figura 10. Inhibición de la TRMPSS humana por el nafomostat. La estructura del complejo fármaco-enzima se ha generado a partir de PDB 7MEQ

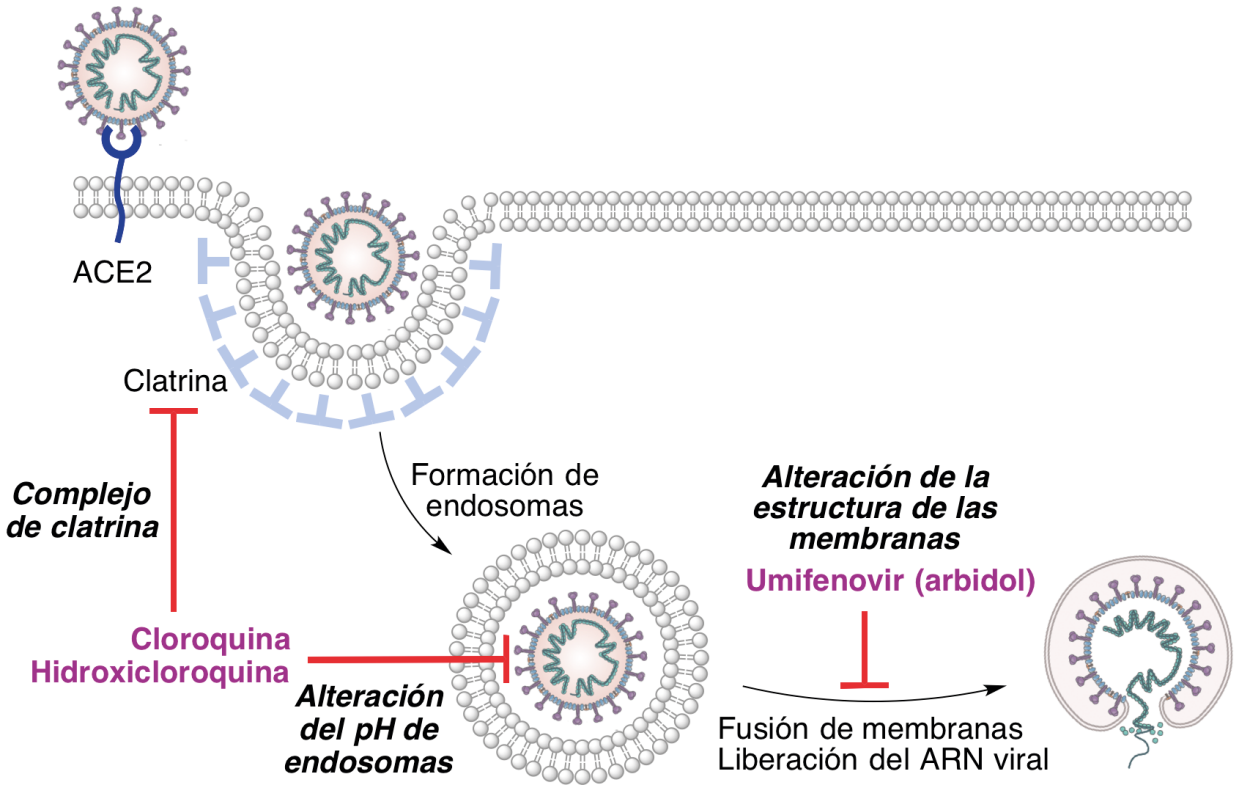


Figura 11. El proceso de liberación del genoma viral y algunas dianas terapéuticas relacionadas

proteasas de serina, esta enzima actúa a través de una tríada catalítica, formada en este caso por los residuos Asp-345, His-296 y Ser-441, hacia la cual queda orientado el grupo éster de los fármacos. Tras su reacción con el grupo éster, el resto de serina queda acilado, como se muestra en la figura 10 (Fraser *et al.* 2022).

6. FÁRMACOS QUE DIFICULTAN LA LIBERACIÓN DEL GENOMA VÍRICO

Una vez que la partícula viral está dentro de un endosoma, una reducción del pH provocada por la fusión con lisosomas promueve la fusión de la membrana del endosoma con la del virus, liberándose la nucleocápside del virus en el citoplasma de la célula hospedadora. Este proceso puede alterarse mediante fármacos que alteran el pH de los endosomas o que dificultan el proceso de fusión de las membranas (fig. 11).

6.1. Cloroquina e hidroxicloroquina

El antimalárico cloroquina y su metabolito hidroxicloroquina han demostrado actividad contra varios virus, incluyendo SARS-CoV 2 (Wang *et al.* 2020). Aunque intervienen otros mecanismos, incluyendo la interacción con las clatrinas, el que parece tener más relevancia es el de alteración del pH de los endosomas. Estos fármacos se caracterizan por presentar dos nitrógenos básicos, el nitrógeno heterocíclico del fragmento de 4-aminoquinolina y el de la amina terciaria de la cadena lateral. Como consecuencia, en el interior de vacuolas ácidas intracelulares pueden generarse una especie monoprotonada (CQH^+) y otra diprotonada (CQH^{2+}), que, a causa de su reducida lipofilia, quedan atrapadas en la vesícula (fig. 12). Estas reacciones de protonación reducen la acidez del medio interno de la vesícula y dificultan el proceso de fusión de membranas. Además, ambos fármacos poseen propiedades immunomoduladoras, y de hecho la hidroxicloroquina se utiliza para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. Por tanto, estos compuestos pueden contribuir a suprimir la respuesta inmune exacerbada característica de las formas graves de COVID-19.

Tanto la cloroquina como la hidroxicloroquina se utilizaron en la primera ola de COVID-19, pero estudios clínicos posteriores no han mostrado evidencias convincentes de que estos fármacos proporcionen un beneficio terapéutico claro en la infección por SARS-CoV 2 (Das *et al.* 2021; Saghir *et al.* 2021).

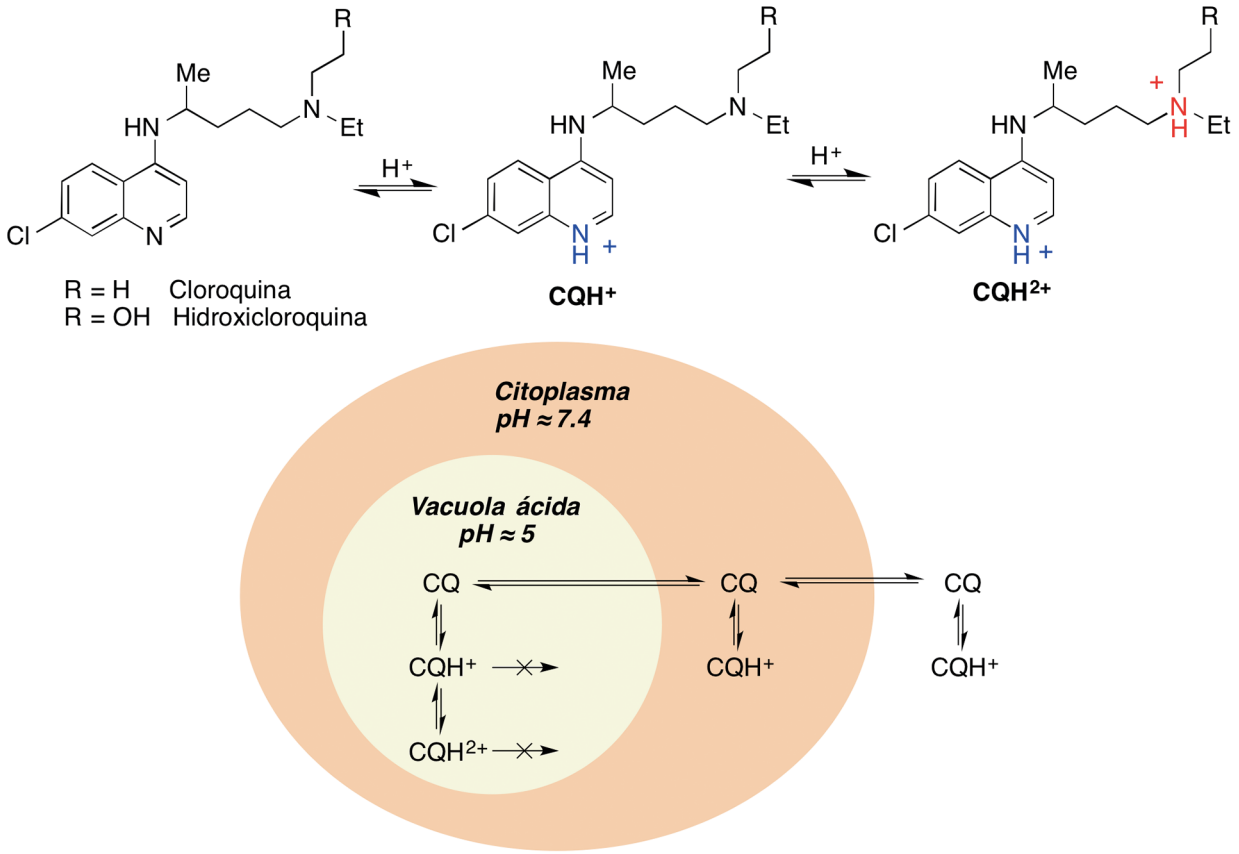


Figura 12. Equilibrios ácido-base de la cloroquina e hidroxicloroquina y acumulación de sus derivados protonados en vesículas ácidas

6.2. Unifenovir

El umifenovir (arbidol) ya se ha mencionado como un antiviral de amplio espectro (gripe, hepatitis C, SARS-CoV-2), aprobado en China y Rusia para el tratamiento de la gripe. Tiene una elevada afinidad por las membranas, ya que forma varios enlaces con la cabeza polar de los fosfolípidos, además de que algunas partes lipófilas de la molécula establecen interacciones hidrofóbicas con las cadenas apolares (fig. 13). La estabilización de la membrana del virus y de la célula hospedadora por este mecanismo dificulta su proceso de fusión. El umifenovir ha sido sometido a varios ensayos clínicos en pacientes de COVID, y un meta-análisis ha revelado que su uso como único tratamiento no supone una mejora respecto a la ausencia de tratamiento antiviral o al uso de otros antivirales, aunque su adición a la combinación lopinavir/ritonavir mejoró la respuesta a ésta (Amani *et al.* 2021).

7. INHIBIDORES DE PROTEASAS VÍRICAS

El genoma viral liberado en el citoplasma de la célula hospedadora es ARN de sentido positivo, por lo que es capaz de interaccionar directamente con los ribosomas de la célula e inducir su traducción. De esta manera, el virus induce a la maquinaria celular a sintetizar una poliproteína que después debe ser hidrolizada para que a partir de ella surjan las proteínas estructurales y funcionales del virus, incluyendo la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp).

Esta hidrólisis la llevan a cabo dos proteasas virales: la proteasa tipo 3C (3CLpro) y la proteasa tipo papaína (PLpro).

7.1. La combinación lopinavir-ritonavir

El lopinavir inhibe la proteasa 3C, que es una proteasa de cisteína, probablemente por analogía con el estado de transición de la reacción de hidrólisis (fig. 14). Debido a que este fármaco es metabolizado rápidamente por el citocromo CYP3A4, se asocia al ritonavir, un inhibidor de dicha enzima metabólica.

La combinación lopinavir/ritonavir (Kaletra® o Aluvia®) se utilizó ampliamente durante la primera ola de la pandemia, pero los ensayos clínicos posteriores han demostrado falta de eficacia.

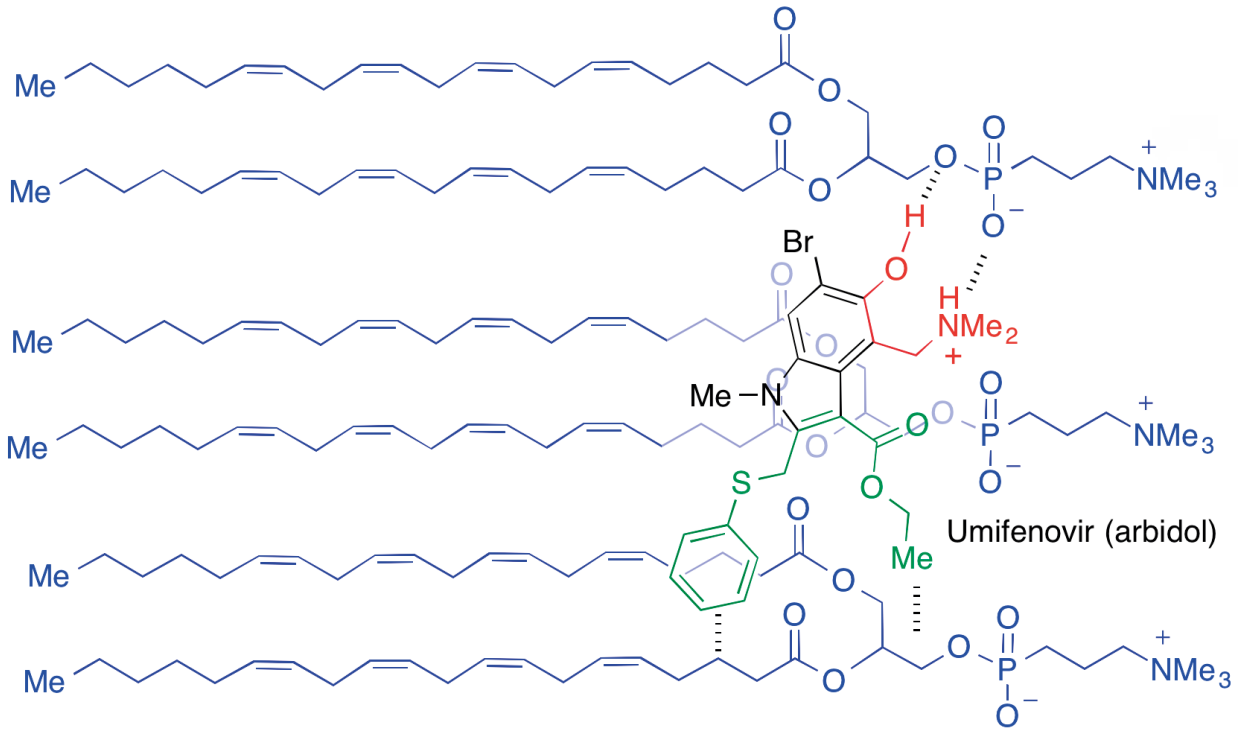


Figura 13. Interacción del umifenovir con los fosfolípidos de membrana

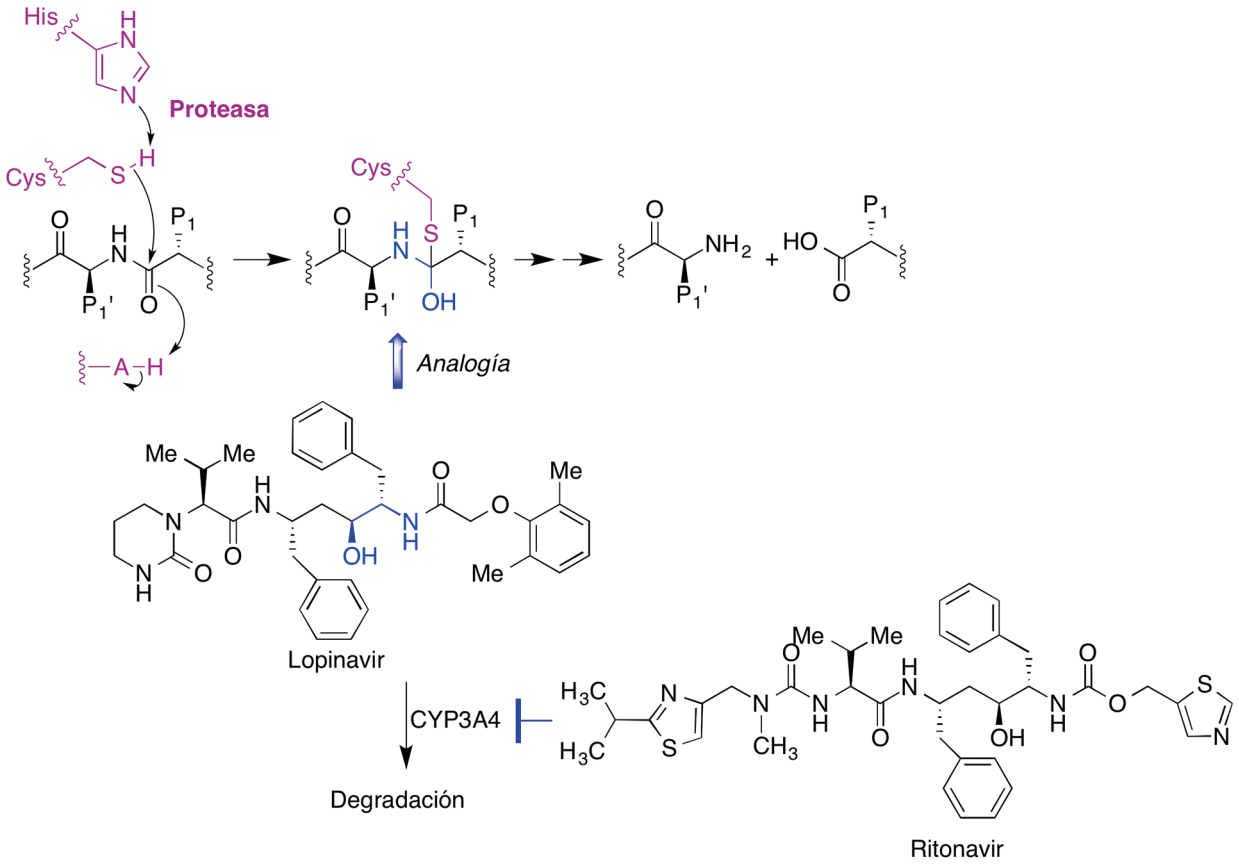


Figura 14. Estructura y mecanismo de acción del lopinavir y fundamento de su asociación con el ritonavir

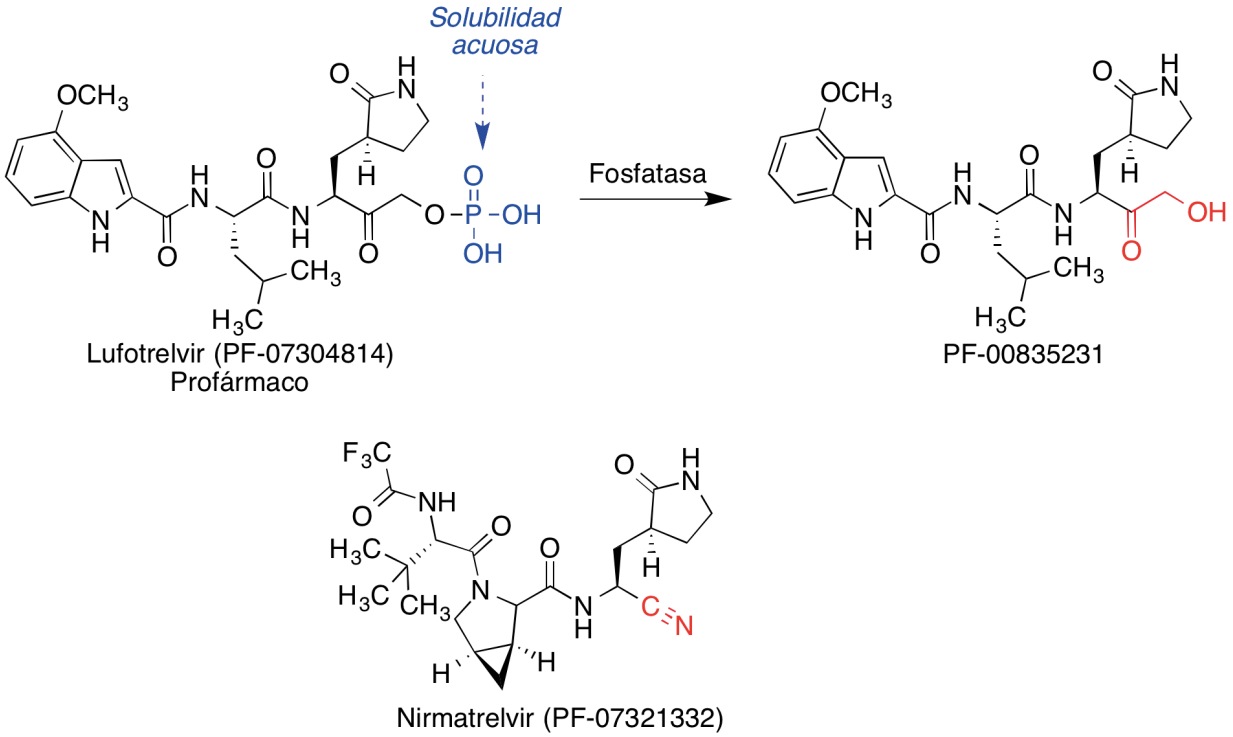


Figura 15. Otros inhibidores de la proteasa 3C viral: lufotrelvir y nirmatrelvir

7.2. Lufotrelvir y nimatrelvir

Otro compuesto en fase de ensayo clínico que actúa inhibiendo la proteasa 3C es el lufotrelvir (PF-07304814), de Pfitzer, un profármaco hidrosoluble de tipo fosfato para uso intravenoso cuya hidrólisis tisular genera la especie activa PF-00835231 (fig. 15). El lufotrelvir se desarrolló inicialmente durante la epidemia SARS-CoV de 2002-2003, y se comporta como un inhibidor de amplio espectro de proteasas de coronavirus. Recibió autorización de la FDA para su uso de emergencia contra SARS-CoV-2, aunque ha sido desplazado por su análogo nimatrelvir (PF-073021332), de la misma empresa. Este último presenta la ventaja de ser activo por vía oral, y su combinación con el potenciador farmacocinético ritonavir, previamente mencionado, ha ofrecido datos clínicos muy esperanzadores, al mostrar una eficacia en torno al 88 % en la prevención de la hospitalización de pacientes adultos, siempre que se administre en los 5 días posteriores al inicio de los síntomas de la enfermedad. Por este motivo, la FDA autorizó en diciembre de 2021 su uso como medicación de emergencia bajo el nombre Paxlovid®.

Tanto la forma activa del lufotrelvir (PF-00835231) como el nirmatrelvir interaccionan de forma covalente, aunque reversible, con el residuo Cys-145 del sitio activo de la proteasa viral. En el caso de PF-00835231(Hoffman *et al.* 2020), el grupo mercapto de dicha cisteína forma un enlace covalente con el grupo carbonilo de la estructura terminal de tipo α-hidroxicetona, generando un hemitioacetal estabilizado por varios enlaces de hidrógeno (fig. 16A). Por su parte, en el caso del nirmatrelvir (Zhao *et al.* 2021) la Cys-145 se une covalentemente al grupo nitrilo del fármaco dando lugar a un tioimidato a través de una reacción de Pinner, y un enlace de hidrógeno refuerza la interacción (fig. 16B).

8. FÁRMACOS QUE IMPIDEN LA REPLICACIÓN DEL GENOMA VIRAL

8.1. Introducción

Una de las proteínas virales sintetizadas por los ribosomas de las células invadidas es la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp, nsp12), que a su vez sintetiza una serie de ARNs virales incluyendo el ARN genómico y varios ARN subgenómicos, cuya traducción origina posteriormente las proteínas virales. Existen fármacos capaces de inhibir tanto la ARN polimerasa viral como su replicación (fig. 17).

Una estrategia habitual en el diseño de fármacos antivirales es la inhibición de ARN polimerasa. Los inhibidores de esta enzima son generalmente nucleósidos modificados por alteraciones en las nucleobases y/o la unidad de ribosa. Tras su trifosforilación, estos compuestos son sustratos de las ARN polimerasas, lo que lleva a su incorporación a cadenas de ARN en crecimiento. Sin embargo,

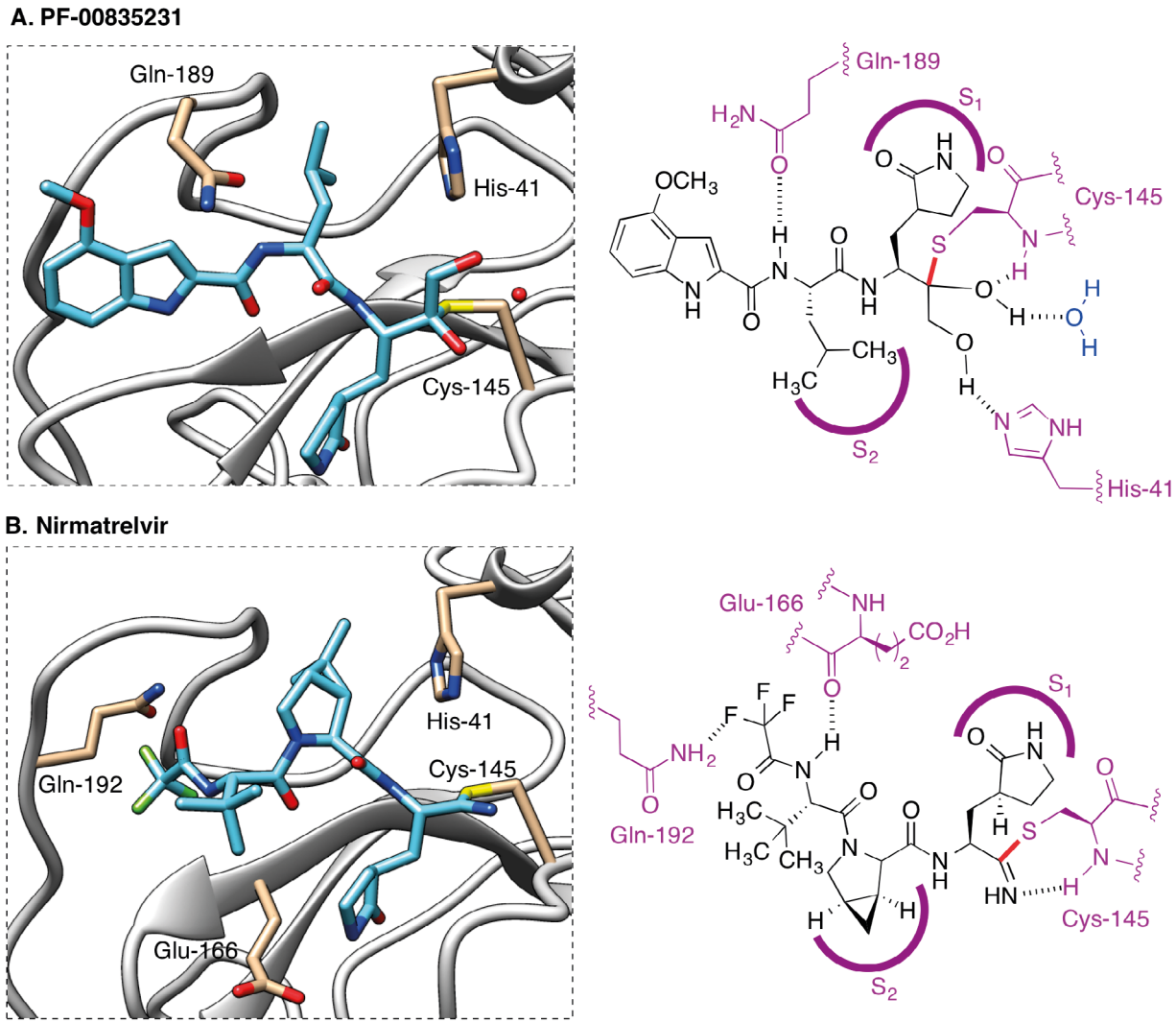


Figura 16. Interacción de la proteasa 3CL de SARS-CoV2 con: A, PF-00835231 (PDB 6XHM). B, nirmatrelvir (PDB 7VH8)

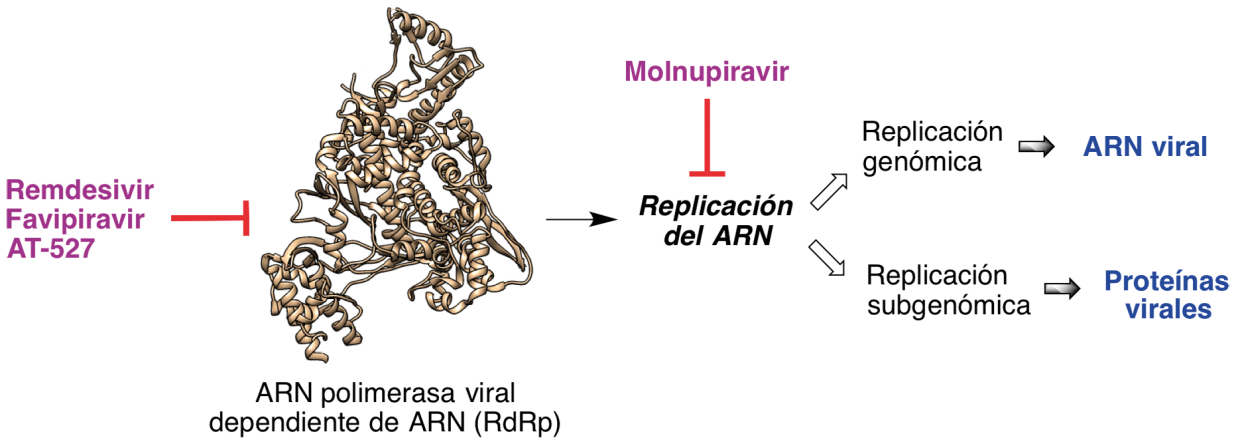


Figura 17. Procesos implicados en la replicación del ARN viral. La estructura de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN ha sido generada a partir de PDB 6M71

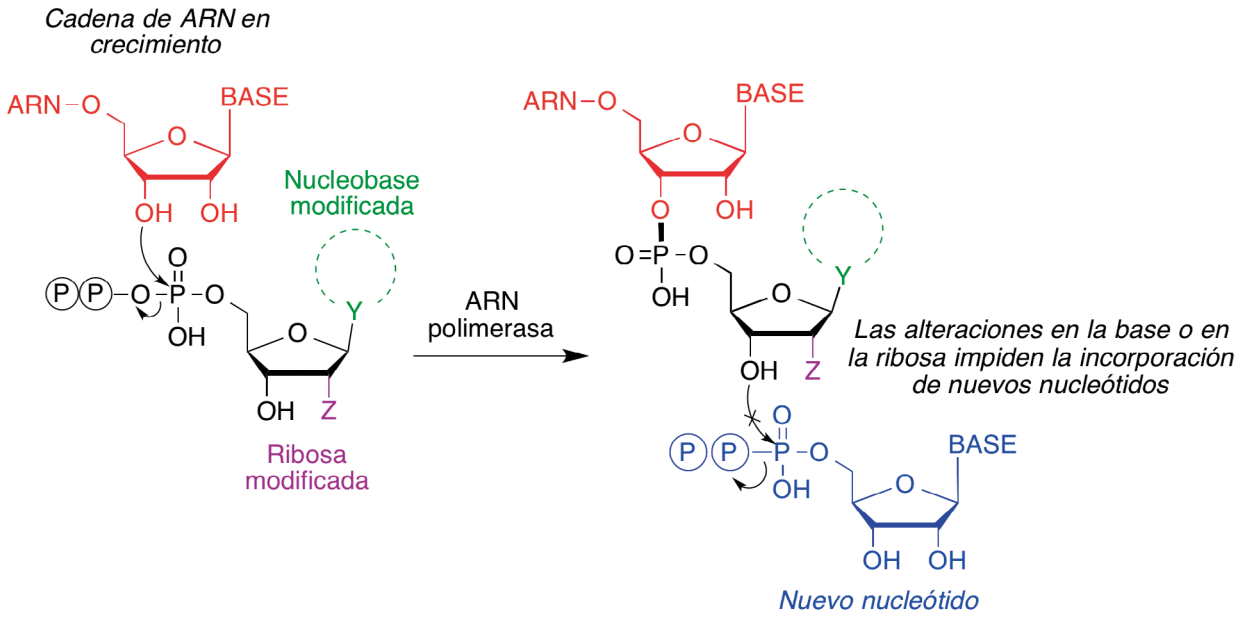


Figura 18. Diseño general de inhibidores de ARN polimerasas

las modificaciones estructurales realizadas impiden la incorporación de nucleótidos adicionales (fig. 18).

8.2. Remdesivir

El remdesivir (GS-5734, Veklury®), de Gilead Sciences, fue el primer fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de COVID-19. Este compuesto inhibe la reacción de polimerización responsable de la síntesis del ARN vírico por acción directa sobre la ARN polimerasa viral dependiente de ARN. Uno de los sustratos de esta enzima es el ATP, cuya estructura imita el remdesivir una vez bioactivado. Como se resume en la figura 19, el fragmento de adenina de este fármaco está modificado y la unión a la ribosa es un enlace carbono-carbono, haciendo que el compuesto sea un C-nucleósido. La presencia de un grupo ciano en el carbono anomérico es poco habitual, y se justificó inicialmente por conducir a una menor actividad inhibidora de las ARN polimerasas de mamífero, pero también resulta crucial para el modo de acción del fármaco. Por último, hay que destacar que el remdesivir es un profármaco, ya que su átomo de fósforo se encuentra en forma de una función fosforamidato, que debe metabolizarse a fosfato. Aunque lo habitual es que los fármacos derivados de nucleósidos ejerzan su acción en forma de difosfato o trifosfato, estas especies muy raramente se emplean como tales, ya que su elevada polaridad a pH fisiológico impide que se absorban bien a través de membranas celulares. Los profármacos de tipo fosforamidato y relacionados, desarrollados por McGuigan, son descritos generalmente como *ProTide* (*PROdrug* + *nucleoTIDE*), habiendo alcanzado una amplia difusión en los últimos años en varios ámbitos del descubrimiento de fármacos (Serpi *et al.* 2021). Estos compuestos tienen sus grupos ionizables bloqueados por sustituyentes lipófilos, lo que permite un buen paso a través de membranas lipófilas y por tanto asegura la entrada del profármaco en las células infectadas por el virus.

Una vez en el interior de la célula, el profármaco se activa mediante la serie de reacciones que se resume en la figura 20. Como primer paso, la hidrólisis del éster carboxílico, el grupo más vulnerable al metabolismo conduce al correspondiente ácido carboxílico. La proximidad de la función fosforamidato permite una reacción de ciclación, no enzimática, que proporciona una estructura de anhídrido mixto, que es químicamente muy reactiva y por tanto es hidrolizada por una molécula de agua. Finalmente, la fosforamida resultante es hidrolizada por una amidasa, resultando el nucleótido GS-441524 en forma de monofosfato. Cabe resaltar que de esta manera se evita la primera etapa de fosforilación, que sería necesaria en caso de administrar el compuesto en forma de nucleósido y que es frecuentemente una reacción lenta. Dos etapas adicionales de fosforilación, catalizadas por quinasas celulares, conducen finalmente a la especie activa, en forma de trifosfato.

Este compuesto es lo bastante parecido a la adenosina trifosfato, uno de los sustratos de la polimerasa, para que ésta lo incorpore a una cadena de ARN en crecimiento. La unión de la especie activa del remdesivir permite la incorporación de tres nucleótidos más, pero en ese momento se interrumpe el crecimiento de la cadena porque el movimiento de la cadena en formación dentro del sitio activo de la polimerasa lleva a que el grupo ciano

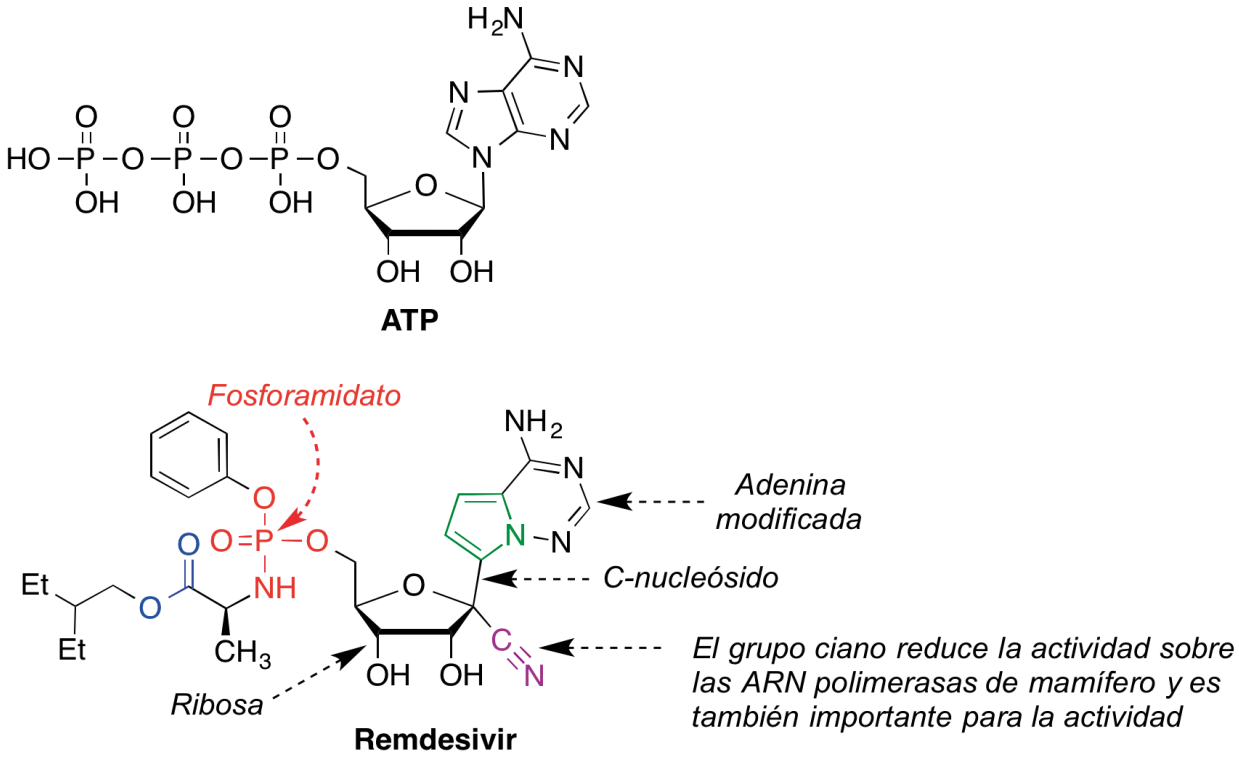


Figura 19. Principales elementos del diseño del remdesivir

interaccione con la cadena lateral de un residuo de serina, quedando bloqueada la síntesis del ARN vírico (Wu *et al.* 2021) (fig. 21).

El remdesivir se propuso inicialmente para el tratamiento de la hepatitis C y se investigó posteriormente para la fiebre hemorrágica causada por el virus del Ébola. En 2015 se demostró su efectividad en monos *Rhesus* infectados con dicho virus, llegándose a administrar el compuesto a humanos durante las epidemias de Ébola que surgieron en diversas regiones de África. Sin embargo, un ensayo clínico llevado a cabo en 2019 demostró poca eficacia en humanos en comparación con otros tratamientos, aunque también reveló una buena seguridad. Debido a su mecanismo de acción, se planteó que el remdesivir podría ser útil en infecciones por otros virus que, como el Ébola, tuvieran como material genético

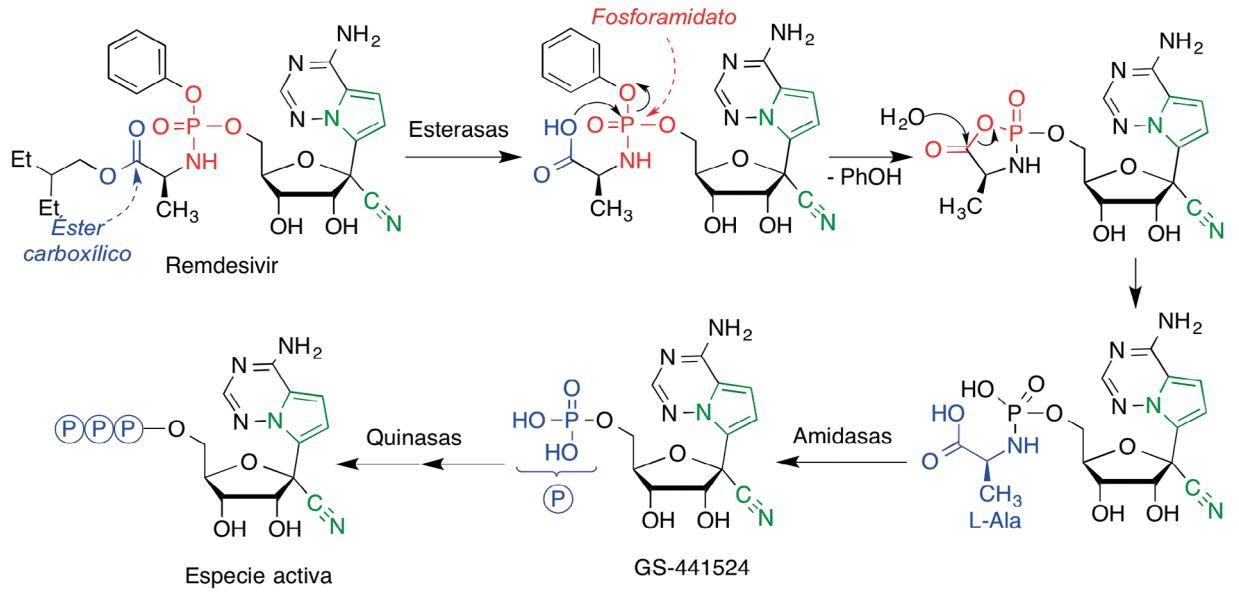


Figura 20. Bioactivación del remdesivir

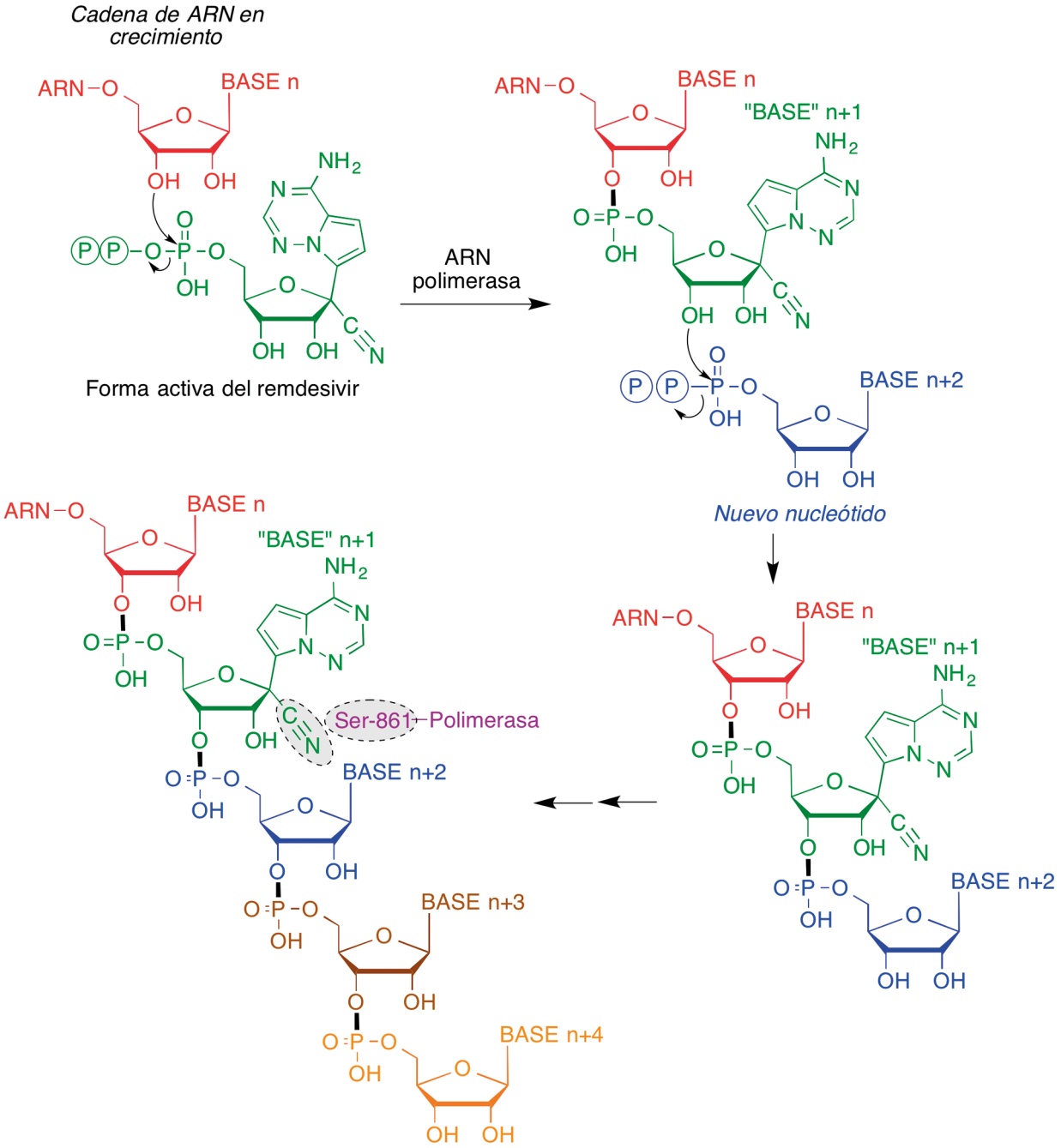


Figura 21. Inhibición de la ARN polimerasa por el metabolito activo del remdesivir

ARN monocatenario, incluyendo el SARS-CoV-2. Tras varios estudios clínicos, el remdesivir se convirtió en el primer antiviral aprobado para el tratamiento de COVID-19 (EMA, junio de 2020; FDA, octubre de 2020), aunque la evidencia disponible sigue siendo inconsistente. Algunos ensayos clínicos posteriores han demostrado que el tiempo hasta la recuperación clínica es más rápido en pacientes que recibieron remdesivir que en los que reciben placebo. Está recomendado en pacientes que precisen ingreso hospitalario y oxígeno a bajo flujo, así como en adultos que no requieren oxígeno suplementario y que presentan un riesgo más alto de evolucionar a COVID-19 grave, ya que disminuye el riesgo de hospitalización (Grundeis *et al.* 2023).

8.3. Bemnifosbuvir (AT-527)

Otro profármaco de familia ProTide es el compuesto conocido como bemnifosbuvir (AT-527), desarrollado por Atea Pharmaceuticals y Roche, que ha alcanzado ensayos clínicos de fase III contra COVID-19. Este compuesto se bioactiva por el mecanismo comentado anteriormente,

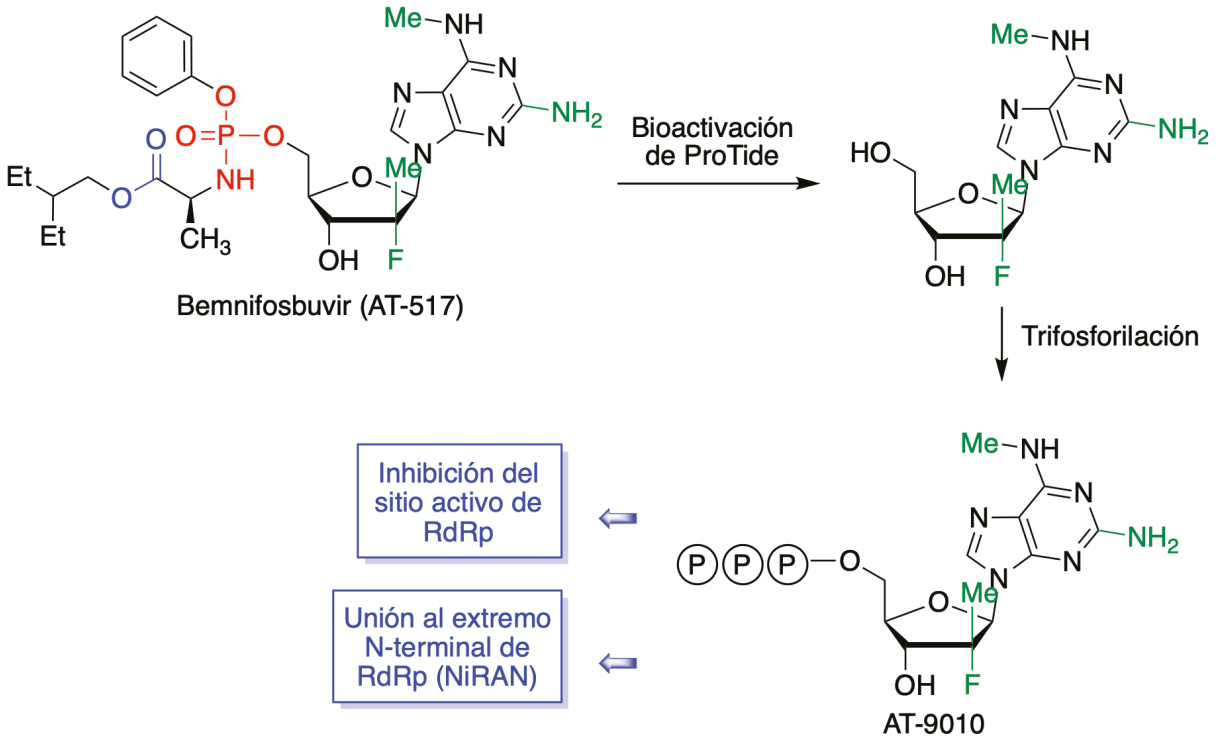


Figura 22. Bioactivación y modo de acción de bemnifosbuvir

lo que conduce a un análogo fluorado de adenosina. Tras su trifosforilación a AT-9010, este puede entrar en el sitio activo de la proteína RdRp, pero las modificaciones en el anillo de ribosa (2'-fluoro, 2'-metil) impide el alineamiento correcto del siguiente nucleótido y por tanto inhibe el crecimiento posterior de la cadena de ARN en formación (fig. 22). Además, la resolución del complejo formado por AT-9010 y la ARN polimerasa por técnicas de criomicroscopía electrónica ha mostrado que AT-9010 es capaz de unirse también al dominio –N terminal– de RdRp, conocido como NiRAN, en una orientación opuesta a la de los nucleósidos trifosfato nativos (Shannon *et al.* 2022).

8.4. Favipiravir

El favipiravir (T-705) es otro inhibidor de ARN polimerasas virales, desarrollado por Toyama Chemical. Es activo contra varios virus de ARN, incluido el de la gripe, y está comercializado en Japón para esta indicación, habiéndose empleado también como tratamiento experimental del virus Ébola. Se trata de un análogo de las bases pirimidínicas del ARN, que necesita un proceso de bioactivación por transformación en el correspondiente nucleósido trifosfato (fig. 23). El favipiravir se ha estudiado en Japón contra el coronavirus SARS-CoV-2 y ha sido aprobado en Rusia y otros países.

8.5. Otros inhibidores de ARN polimerasas

Algunos inhibidores adicionales de ARN polimerasas víricas que se han ensayado en clínica contra COVID-19, generalmente en combinación con otros antivirales, son el galidesivir, de BioCryst y dos profármacos desarrollados por Gilead Sciences, el sofosbuvir (Sovaldi®) y el tenofovir disoproxil (Viread®) (fig. 24).

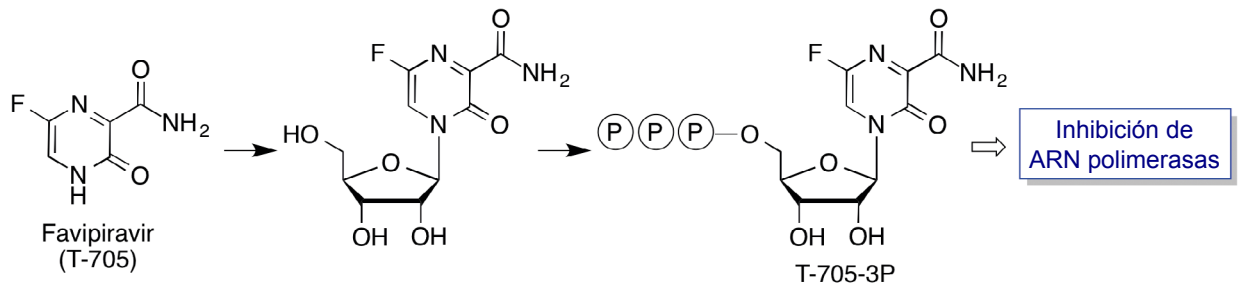


Figura 23. Bioactivación y modo de acción del favipiravir

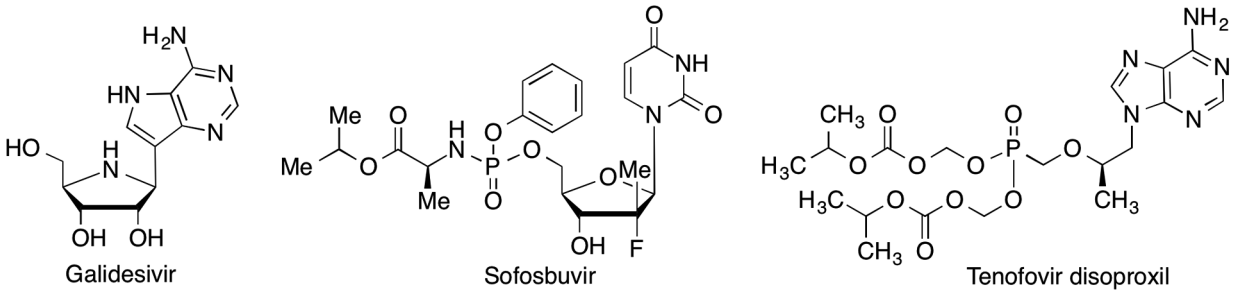


Figura 24. Estructuras de otros inhibidores de ARN polimerasas víricas ensayados contra COVID-19

9. MOLNUPIRAVIR

El molnupiravir (EIDD-2801, Lagevrio®) fue diseñado como profármaco de la N-hidroxicitidina (EISS-193) para evitar la fosforilación de primer paso de la especie activa. La N-hidroxicitidina es liberada por hidrólisis y, una vez trifosforilada, puede incorporarse a cadenas de ARN viral. La N-hidroxicitidina existe en dos formas tautoméricas, de las cuales la hidroxilamina tiene afinidad por guanina, no causando alteraciones, pero la oxima la tiene por adenina, dando lugar a errores durante la replicación del ARN viral (fig. 25).

El molnupinavir, que tiene la ventaja de ser activo por vía oral, recibió en diciembre de 2021 autorización de la FDA para su uso de emergencia en casos moderados de COVID-19, y también una autorización temporal de

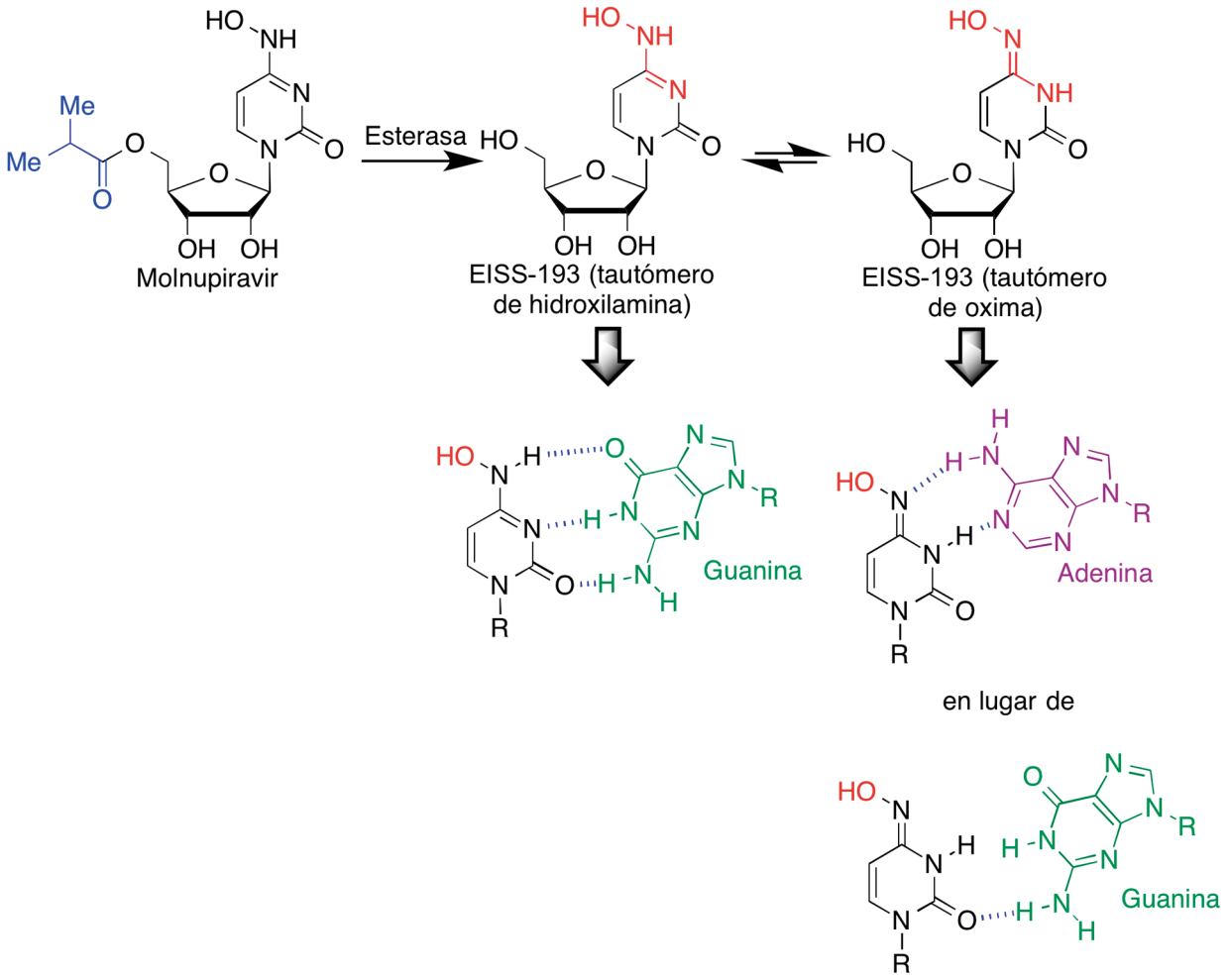


Figura 25. Mecanismo de acción del molnupiravir

uso de la EMA a pesar de que los ensayos clínicos parecen indicar que el fármaco es menos efectivo que lo que hacían esperar los datos iniciales. Un modelo matemático ha mostrado que la efectividad antiviral del molnupiravir es del 56 %, es decir, que es capaz de inhibir el 56 % de la replicación de las células infectadas por día (Bai 2022). El molnupiravir puede causar daños fetales y por tanto no está recomendado durante el embarazo. A causa de su mecanismo de acción, basado en la generación de mutaciones, también existe cierta preocupación en cuanto a la posibilidad de que su uso amplio pueda dar lugar a nuevas variantes del virus (Kozlov 2021).

10. ANTIVIRALES QUE ACTÚAN EN DIANAS DEL HOSPEDADOR

La estrategia consistente en bloquear proteínas del hospedador humano que sean utilizadas por el virus durante su ciclo de multiplicación celular presenta la ventaja de que los fármacos resultantes deberían ser activos en todas las variantes del virus, ya que estas dianas no se ven afectadas por posibles mutaciones en las dianas víricas.

10.1. Plitidepsina

La plitidepsina (Aplidina®) es un ciclodepsipéptido natural aislado inicialmente del tunicado marino *Asplidium albicans* y obtenido actualmente por síntesis. Ha sido desarrollado por PharmaMar como antitumoral, especialmente para el tratamiento del mieloma múltiple. Su diana como agente antiviral es el factor de elongación humano eEF1A (White *et al.* 2021), que el virus utiliza para facilitar la llegada de aninoacil-tRNAs al ribosoma y que por tanto es esencial para la traslación del ARN viral y de los mRNAs subgenómicos que codifican las proteínas estructurales y accesorias del virus (fig. 26) (Papapanou *et al.* 2021). La plitidepsina se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase 3 y ha demostrado una actividad superior a la de otros antivirales como el remdesivir.

10.2. Ivermectina

Otro compuesto que ha demostrado actividad antiviral relacionada con el bloqueo de una diana presente en las células humanas es la ivermectina (fig. 27). Se utiliza ampliamente como antiparasitario en veterinaria, y también

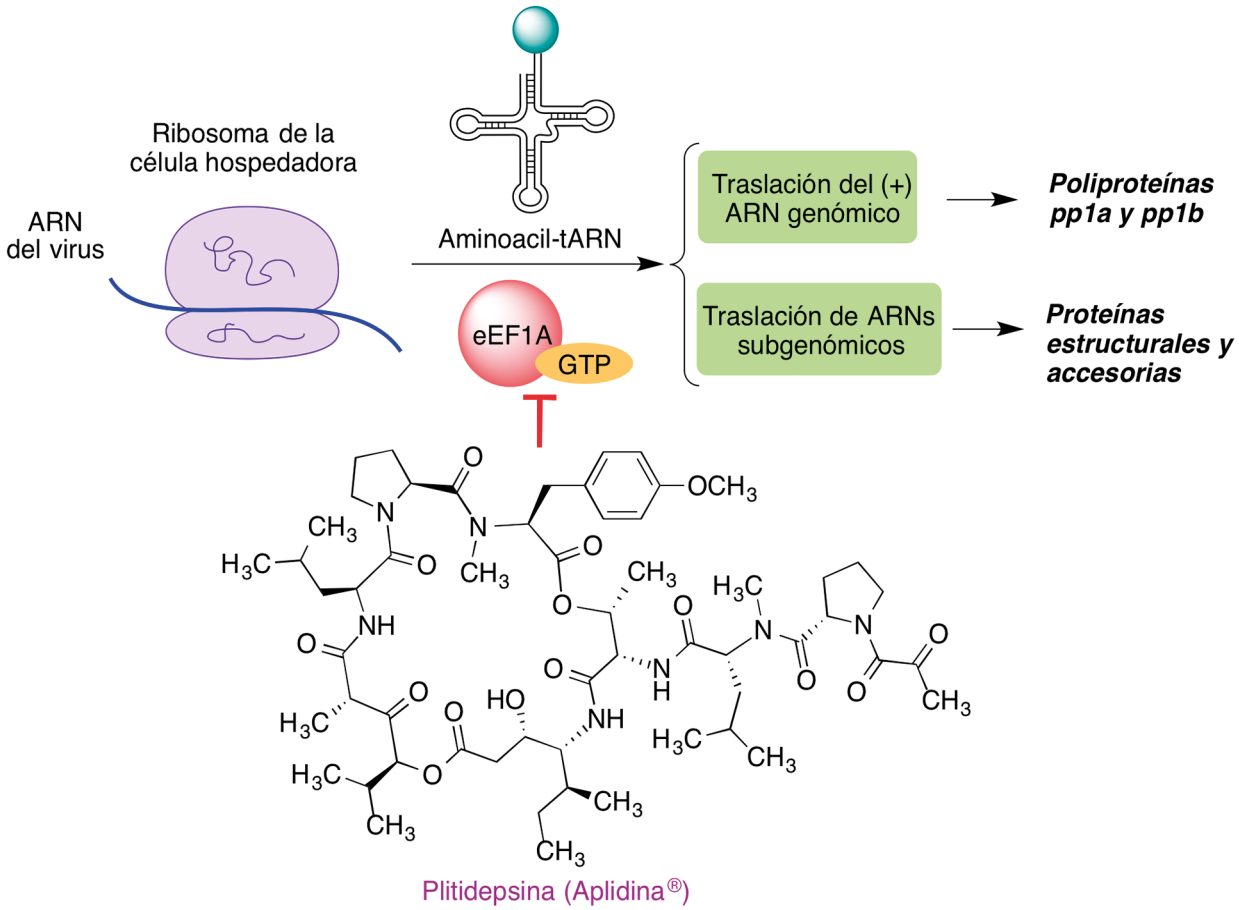


Figura 26. Mecanismo de acción de la plitidepsina contra SARS-CoV-2

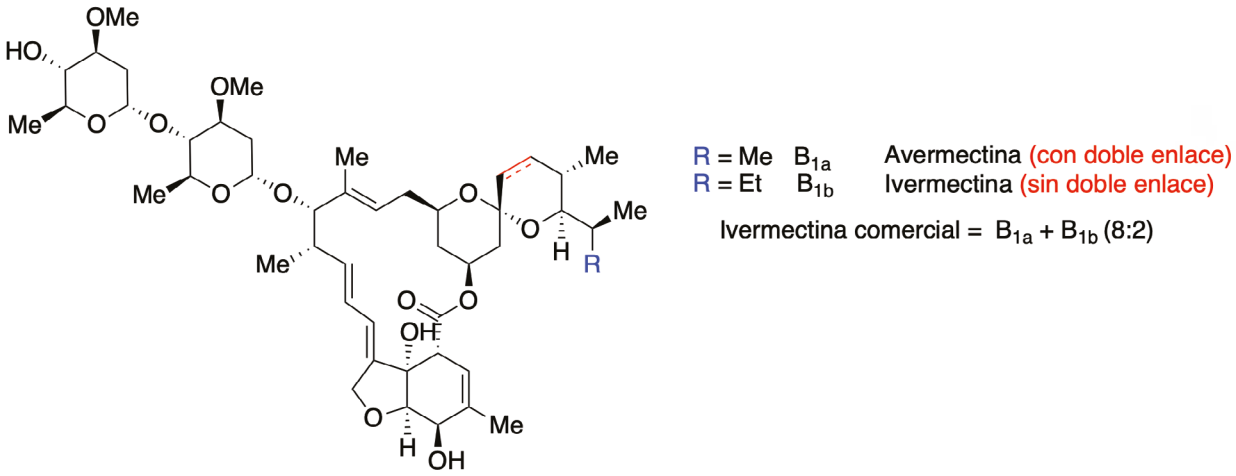


Figura 27. Estructura de la ivermectina

está aprobada como antihelmíntico de uso humano. En cuanto a su uso como antiviral en COVID-19, actúa en múltiples dianas, incluyendo la proteína S del virus. Por otra parte, bloquea también las importinas del hospedador, que actúan como proteínas de transporte de proteínas virales (ORF-3a, ORF-6, NSP-1) desde citoplasma al núcleo. Estas proteínas facilitan el proceso de infección vírica porque bloquean la producción de interferón, un antiviral endógeno. Además, la ivermectina es antiinflamatoria.

Como sucedió también con la cloroquina, la eficacia clínica de la ivermectina se ha convertido en Estados Unidos en un asunto conflictivo y altamente politizado, lo que dificulta llegar a conclusiones definitivas sobre su utilidad. Recientemente, un metaanálisis de 15 ensayos clínicos con ivermectina demostró una reducción del riesgo de muerte de pacientes de COVID-19 con significación estadística entre moderada y alta, especialmente para evitar la progresión de la enfermedad hacia etapas de mayor gravedad, y una evidencia inferior de sus beneficios como agente de prevención (Bryant *et al.* 2021). Sin embargo, otros metaestudios no han permitido apoyar el uso de la ivermectina para el tratamiento o prevención de COVID-19 salvo en situaciones de ensayo clínico, lo cual es también la recomendación de la Organización Mundial de la Salud y de diversas agencias regulatorias, incluyendo la FDA y la EMA.

CONCLUSIONES

A pesar de su gran importancia para el control definitivo de la pandemia, la terapia farmacológica de COVID-19 está todavía en sus inicios. La existencia de dos fases claramente diferenciadas en la enfermedad, la de infección vírica y la inflamatoria, condiciona el tipo de terapias aplicables. Los principales fármacos antivirales conocidos actúan directamente en la proteína S del virus, en los procesos de entrada a la célula y liberación del genoma viral en el interior de la célula, como inhibidores de las proteasas víricas que se encargan del procesado de la poliproteína resultante de la traslación del genoma del virus o impiden la replicación del genoma viral por inhibición de la ARN polimerasa viral dependiente de ARN. Son especialmente interesantes los antivirales que actúan en dianas del hospedador, como el factor de elongación eEF1A o las importinas, porque su actividad no debería verse afectada por mutaciones en el virus. Es de esperar que la investigación en fármacos orientados a estas o a otras dianas culmine en el descubrimiento de una terapia segura y eficaz contra COVID-19, que probablemente deba basarse en terapias de combinación.

BIBLIOGRAFÍA

AGRAWAL, U., RAJU, R. & UDWADIA, Z. F. (2020), Favipiravir: A New and Emerging Antiviral Option in COVID-19. Medical Journal Armed Forces India 76: 370-376.

AMANI, B., AMANI, B., ZAREEI, S. & ZAREEI, M. (2021), Efficacy and Safety of Arbidol (Umifenovir) in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. Immunity, Inflammation and Disease 9: 1197-1208.

BAI, Y., SHEN, M. & ZHANG, L. (2022), Antiviral Efficacy of Molnupiravir for COVID-19 Treatment. Viruses 14: 763.

BRYANT, A., LAWRIE, T. A., DOWSWELL, T., ..., MITCHELL, S., HILL, S. & THAM, T. C. (2021), Ivermectin for Prevention and Treatment of COVID-19 Infection: A Systematic Review, Meta-Analysis, and Trial Sequential Analysis to Inform Clinical

Guidelines. American Journal of Therapeutics 28: e434-e460.

DAS, S., RAMACHANDRAN, A. K.; BIRANGAL, S. R., AKBAR, S., AHMED, B. & JOSEPH, A. (2021), The Controversial Therapeutic Journey of Chloroquine and Hydroxychloroquine in the Battle against SARS-CoV-2: A Comprehensive Review. Medicine in Drug Discovery 10: 100085.

ESPOSITO, R., MIRRA, D., SPORTIELLO, L., SPAZIANO, G. & D'AGOSTINO, B. (2022), Overview of Antiviral Drug Therapy for COVID-19: Where Do We Stand? Biomedicines 10: 2815.

FDA; https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-releases-important-information-about-risk-covid-19-due-certain-variants-not-neutralized-evusheld (consultada el 07-10-2023).

FRASER, B. J., BELDAR, S., SEITOVA, A., ..., HALABELIAN, L., ARROWSMITH, C. H. & BÉNARD, F. (2022), Structure and Activity of Human TMPRSS2 Protease Implicated in SARS-CoV-2 Activation. Nature Chemical Biology 18: 963-971.

GHOSH, A. K., BRINDISI, M., SHAHABI, D., CHAPMAN, M. E. & MESECAR, A. D. (2020), Drug Development and Medicinal Chemistry Efforts toward SARS-Coronavirus and COVID-19 Therapeutics. ChemMedChem 15: 907-932.

GIL, C., GINEX, T., MAESTRO, I., ..., ALONSO, C., CAMPILLO, N. E. & MARTÍNEZ, A. (2020), COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. Journal of Medicinal Chemistry 63: 12359-12386.

GRUNDEIS, F., ANSEMS, K., DAHMS, K., ..., GRIESEL, M., FICHTNER, F. & STEGEMANN, M. (2023), Remdesivir for the Treatment of COVID-19. Cochrane Database Systematic Reviews CD014962.

GUNST, J. D., STAERKE, N. B., PAHUS, M. H., ..., HØJEN, J. F., KJOLBY, M. & SØGAARD, O. S. (2021), Efficacy of the TMPRSS2 Inhibitor Camostat Mesilate in Patients Hospitalized with COVID-19-A Double-Blind Randomized Controlled Trial. EClinicalMedicine 35: 100849.

HOFFMAN, R. L., KANIA, R. S., BROTHERS, M. A., ..., SOLOWIEJ, J. E., STEPPAN, C. M. & TAGGART, B. (2020), Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. Journal of Medicinal Chemistry 63: 12725-12747.

JANG, S. & RHEE, Y. (2020), Three Cases of Treatment with Nafamostat in Elderly Patients with COVID-19 Pneumonia Who Need Oxygen Therapy. International Journal of Infectious Diseases 96: 500-502.

KOZLOV, M. (2021), Merck's COVID Pill Loses Its Lustre: What that Means for the Pandemic. Nature. DOI: 10.1038/d41586-021-03667-0.

KUMAR, S., CHANDELE, A. & SHARMA, A. (2021), Current Status of Therapeutic Monoclonal Antibodies against SARS-CoV-2. PLOS Pathogens 17: e1009885.

LEI, S., CHEN, X., WU, J., DUAN, X. & MEN, K. (2022), Small Molecules in the Treatment of COVID-19. Signal Transduction and Targeted Therapy 7: 387.

LIU, L., IKETANI, S., GUO, Y., CHAN, J. F.-W. & WANG, M. *et al.* (2022), Striking Antibody Evasion Manifested by the Omicron Variant of SARS-CoV-2. Nature 602: 676-681.

MENÉNDEZ, J. C. (2022), Approaches to the Potential Therapy of COVID-19: A General Overview from the Medicinal Chemistry Perspective. Molecules 27: 658.

NCT; https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04723537 (consultada el 07-10-2023).

NIH; COVID-19 Treatment Guidelines. https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov (consultada el 07-10-2023).

PAPAPANOU, M., PAPOUTSI, E., GIANNAKAS, T. & KATSAOUNOU, P. (2021), Plitidepsin: Mechanisms and Clinical Profile of a Promising Antiviral Agent against COVID-19. Journal of Personalized Medicine 11: 668.

PLASSE, T. F., DELGADO, B., POTTS, J, ..., ABRAMSON, D., FEHRMANN, C., FATHI, R. & MCCOMSEY, G. A. (2023), A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study of Upamostat, a Host-Directed Serine Protease Inhibitor, for Outpatient Treatment of COVID-19. International Journal of Infectious Diseases 128: 148-156.

RAHBAR SAADAT, Y., HOSSEINIYAN KHATIBI, S. M., ZUNUNI VAHED, S. & ARDALAN, M. (2021), Host Serine Proteases: A Potential Targeted Therapy for COVID-19 and Influenza. Frontiers in Molecular Biosciences 8: 725528.

SAGHIR, S. A. M., ALGABRI, N. A., ALAGAWANY, M. M., ATTIA, Y. A., ALYILEILI, S. R. *et al.* (2021), Chloroquine and Hydroxychloroquine for the Prevention and Treatment of COVID-19: A Fiction, Hope or Hype? An Updated Review. Therapeutics and Clinical Risk Management 17: 371-387.

SERPI, M. & PERTUSATI, F. (2021), An Overview of ProTide Technology and Its Implications to Drug Discovery. Expert Opinions in Drug Discovery 16: 1149-1161.

SHUSTER, A., PECHALRIEU, D., JACKSON, C. B., ABEGG, D., CHOE, H. & ADIBEKIAN, A. (2021), Clinical Antiviral Drug Arbidol Inhibits Infection by SARS-CoV-2 and Variants through Direct Binding to the Spike Protein. ACS Chemical Biology 16: 2845-2851.

SHANNON, A., FATTORINI, V., SAMA, B., ..., CANARD, C., EYDOUX, C. & SOMMADOSSI, J.-P. (2022),

A Dual Mechanism of Action of AT-527 against SARS-CoV-2 Polymerase. Nature Communications 13: 621.

SHOEMAKER, R. H., PANETTIERI, R. A.; LIBUTTI, S. K., ..., HÖLLER, S., PENNINGER, J. M. & WIRNSBERGER, G. (2022) Development of an Aerosol Intervention for COVID-19 Disease: Tolerability of Soluble ACE2 (APN01) Administered via Nebulizer. PLoS One 17: e0271066.

SIDDIQI, H. K. & MEHRA, M. R. (2020), COVID-19 Illness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical-Therapeutic Staging Proposal. The Journal of Heart and Lung Transplantation 39: 405-407.

TARIGHI, P., EFTEKHARI, S., CHIZARI, M., SABERNAVAEI, M., JAFARI, D. & MIRZABEIGI, P. (2021), A Review of Potential Suggested Drugs for Coronavirus Disease (COVID-19) Treatment. European Journal of Pharmacology 895: 173890.

WANG, M., CAO, R., ZHANG, L., ..., HU, Z., ZHONG, W. & XIAO, G. (2020), Remdesivir and Chloroquine Effectively Inhibit the Recently Emerged Novel Coronavirus (2019-nCoV) In Vitro. Cell Research 30: 269-271.

WHITE, K. M., ROSALES, R., YILDIZ, S.; (...) SHOKAT, K. M., KROGAN, N. V. & GARCÍA-SASTRE, A. (2021), Plitidepsin Has Potent Preclinical Efficacy against SARS-CoV-2 by Targeting the Host Protein eEF1A. Science 371: 926-931.

WU, J., WANG, H., LIU, Q.; (...) WANG, Q., RAO, Z. & GONG, P. (2021), Remdesivir Overcomes the S861 Roadblock in SARS-CoV-2 Polymerase Elongation Complex. Cell Reports 37: 109882.

XU, J., XUE, Y., ZHOU, R., SHI, P.-Y., LI, H. & ZHOU, J. (2021), Drug Repurposing Approach to Combating Coronavirus: Potential Drugs and Drug Targets. Medicinal Research Reviews 41: 1375-1426.

YE, F.; LIN, X., CHEN, Z., ..., WANG, W., WEI, X. W. & LU, G. (2021), S19W, T27W, and N330Y Mutations in ACE2 Enhance SARS-CoV-2 S-RBD Binding toward Both Wild-Type and Antibody-Resistant Viruses and Its Molecular Basis. Signal Transduction and Targeted Therapy 6: 343 (12 pp).

ZHAO, Y., FANG, C. & ZHANG, Q. (2022), Crystal Structure of SARS-CoV-2 Main Protease in Complex with Protease Inhibitor PF-07321332. Protein Cell 13(9): 689-693.

Capítulo XXVIII

La necesidad de descarte de tratamientos en el ámbito de la COVID-19

Daniel Echeverría-Esnal[1,2,3], Olivia Ferrández-Quirante[1,2,4], María Eugenia Navarrete-Rouco[1], Alicia Rodríguez-Alarcón[1], Nuria Carballo[1] y Santiago Grau[1,2,3,5]

[1] *Servicio de Farmacia, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona, España*

[2] *Grupo de investigación de Patología infecciosa y antimicrobianos, Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Biomédicas (IMIM), Barcelona, España.*

[3] *Facultad de Medicina, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España*

[4] *Facultad de Farmacia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España*

[5] *Académico de número de la Real Academia de Farmacia de Cataluña*

INTRODUCCIÓN

El genoma del virus SARS-CoV-2, agente causal de la COVID-19 incluye múltiples proteínas en la membrana, espícula, envoltura y nucleocápside (Maier *et al.* 2015). Al igual que otros virus ARN, el SARS-CoV-2 presenta una predisposición a la producción de mutaciones que pueden afectar tanto a los genes estructurales como no estructurales que lo conforman (Aleem *et al.* 2022). Esta es la razón de la aparición de continuas variantes de preocupación (VOC), del inglés «*variants of concern*», que han ido apareciendo sucesivamente desde el inicio de la pandemia de la COVID-19 (Giovanetti *et al.* 2021). Estas VOC han ido modificando la patogenicidad, transmisibilidad y virulencia del virus. La OMS comunicó, en agosto de 2022, una disminución del 9 % en el número de casos durante la semana del 25 al 31 de julio, cuando se comparó frente a la semana previa, con un registro de 6,5 millones de casos nuevos de esta enfermedad (World Health Organization 2022). A fecha 31 de julio de 2022, se han reportado un total de 574 millones de casos y, aproximadamente, 6,3 millones de fallecimientos por COVID-19.

Asimismo, la aparición de estas VOC y sus sublinages ha originado la necesidad del estudio actualizado de la actividad de las moléculas consideradas como activas frente al virus (Takashita *et al.* 2022). Sin embargo, a pesar de la continua aparición de estudios que han evaluado la actividad de fármacos con distintas estructuras, procedentes de diversos grupos farmacológicos, incluyendo anticuerpos monoclonales, en lugar de aportar evidencias sobre la eficacia de estas moléculas, con frecuencia se han generado controversias sobre su utilidad real en el tratamiento de la COVID-19.

De hecho, el inicio apabullante de la pandemia produjo una desorientación extrema a la hora de conocer el beneficio de diversas moléculas que parecían poseer actividad frente al virus pero que no pudieron demostrarla posteriormente en estudios efectuados, principalmente en el ámbito de la vida real.

La presente revisión tiene como objetivo analizar las moléculas que se utilizaron desde el inicio de la pandemia y con posterioridad y que finalmente fueron descartadas tras la observación de los resultados procedentes de estudios considerados con un diseño adecuado para su evaluación.

1. ANTIBIÓTICOS

1.1. Antibióticos

Las coinfecciones e infecciones secundarias bacterianas y fúngicas son frecuentes en las infecciones víricas y se asocian a una mayor morbilidad y mortalidad (Russell *et al.* 2021). En los pacientes hospitalizados infectados por la gripe, el 23 % presenta una coinfección bacteriana, principalmente por *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus*

pneumoniae (Klein *et al.* 2016). En otros virus esta incidencia es aún mayor y alcanza el 40 % (Thorburn *et al.* 2006). Basándose en estos datos, al principio de la pandemia de COVID-19 se utilizaron ampliamente los antibióticos. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que la tasa de infección bacteriana era menor de lo esperado, con una incidencia del 5,9 % en las salas de hospitalización y del 8,1 % en la UCI (Langford *et al.* 2020), principalmente debido a *S. aureus* y *Haemophilus influenzae* (Russell *et al.* 2021). A pesar de estos datos, la prevalencia de la prescripción de antibióticos fue del 74,6-85,2 %. (Russell *et al.* 2021; Langford *et al.* 2021).

El uso excesivo de antibióticos de manera inadecuada puede agravar la otra pandemia de nuestro siglo, la de la resistencia bacteriana global (Russell *et al.* 2021; Langford *et al.* 2020).

Por todo ello, las directrices internacionales han adaptado sus recomendaciones, reservando el uso de antibióticos para los pacientes en estado crítico o cuando existe una alta sospecha clínica de infección bacteriana (WHO Clinical Management 2021).

1.2. Azitromicina

La azitromicina es un antibiótico que pertenece a la familia de los macrólidos y que se utiliza en una gran variedad de enfermedades bacterianas (Parnham *et al.* 2014). Más allá de su actividad antibacteriana, este macrólido ha mostrado actividades antivirales e inmunomoduladoras que podrían ser de interés en infecciones víricas, incluida la COVID-19.

Este macrólido podría actuar sobre la unión del SARS-CoV-2 a las células respiratorias. Mediante el aumento del pH intracelular se podría alterar la glicosilación de hACE2 y otras proteínas, necesarias para la entrada del virus (Poschet *et al.* 2020). El mecanismo de acción de la azitromicina, junto con el del resto de fármacos, ha sido descrito en la figura 1.

Otros posibles mecanismos incluyen su carácter gangliósido-mímico (Fantini *et al.* 2020). Dado que la proteína *spike* del SARS-CoV-2 muestra un sitio de unión a gangliósidos, la azitromicina podría inhibir la infección del SARS-CoV-2 al unirse a este sitio (Fantini *et al.* 2014). Este antibiótico también podría interferir en la interacción proteína pico/CD147 o en la expresión de CD147 (Ulrich y Pillat 2020). El aumento del pH lisosomal por la azitromicina también puede alterar el proceso de endocitosis y la función de las proteasas lisosomales (catepsinas o furinas), lo que puede dificultar el proceso de fusión del virus (Parnham y Haber 2012; Poschet *et al.* 2020; Nujic *et al.* 2012; Tyteca *et al.* 2002).

Aunque se ha descrito un 37 % de biodisponibilidad oral, la amplia acumulación tisular compensa su absorción subóptima (Parnham y Haber 2014). La azitromicina se acumula en las células epiteliales y los macrófagos alveolares, lo que demuestra su excelente penetración pulmonar (Parnham y Haber 2014; Zheng *et al.* 2014; Danesi *et al.* 2003). Presenta una vida media de 68-79 horas (Parnham y Haber 2014; Zheng *et al.* 2014; Danesi *et al.* 2003).

Este macrólido puede administrarse como 500 mg/24 h durante 3-5 días o 500 mg en el día 1 seguido de 250 mg/24 h en los días 2-5 (Danesi *et al.* 2003).

La azitromicina se considera segura, con un bajo riesgo de efectos adversos graves (Gorelik *et al.* 2018). Los efectos adversos notificados con mayor frecuencia fueron gastrointestinales (náuseas y dolor abdominal), del sistema nervioso central y periférico (cefalea o mareos), hepatotoxicidad y desarrollo de resistencia antibacteriana (Parham y Haber 2014). Su uso se ha relacionado con la prolongación del intervalo QTc, torsade de Pointes, taquicardia ventricular y muerte súbita cardíaca (Gorelik *et al.* 2018).

La azitromicina ha mostrado actividad *in vitro* contra una amplia variedad de virus (Zika, Ébola, rinovirus, enterovirus, gripe) (Damle *et al.* 2020; Tran *et al.* 2019; Iannetta *et al.* 2017; Li *et al.* 2019; Zeng *et al.* 2019). La azitromicina también ha demostrado actividad antiviral *in vitro* frente al SARS-CoV-2 (Touret *et al.* 2020).

Además de su acción antiviral, la azitromicina presenta propiedades antinflamatorias e inmunomoduladoras, como la capacidad de regular a la baja la producción de citoquinas, mantener la integridad de las células epiteliales o prevenir la fibrosis pulmonar (Parnham y Haber 2014; Kanoh y Rubin 2010; Zimmermann *et al.* 2018).

En base a estas propiedades antivirales e inmunomoduladoras, el uso de azitromicina se consideró como una potencial alternativa terapéutica al inicio de la pandemia. Estudios observacionales iniciales demostraron el potencial beneficio clínico de la azitromicina en monoterapia o en combinación con hidroxicloroquina (Rosenberg *et al.* 2020; Arshad *et al.* 2020). Sin embargo, la realización de ECA concluyó que el uso de azitromicina no ofrecía ningún beneficio clínico en pacientes ingresados ni en pacientes ambulatorios con alto riesgo de progresión (Butler *et al.* 2021; Gyselinck *et al.* 2021; Oldenburger *et al.* 2021).

Además de la ausencia de beneficio clínico, su utilización se ha relacionado con problemas de seguridad, principalmente eventos adversos cardíacos, sobre todo en combinación con hidroxicloroquina (Rosenberg *et al.* 2020; Saleh *et al.* 2020; Mercuro *et al.* 2020; Chang *et al.* 2020; Mahevas *et al.* 2020).

En base a esta evidencia, actualmente el uso de azitromicina está desaconsejado en las guías internacionales (Bhimraj *et al.* 2022; Bartoletti *et al.* 2022; COVID-19 Treatment Guidelines 2022).

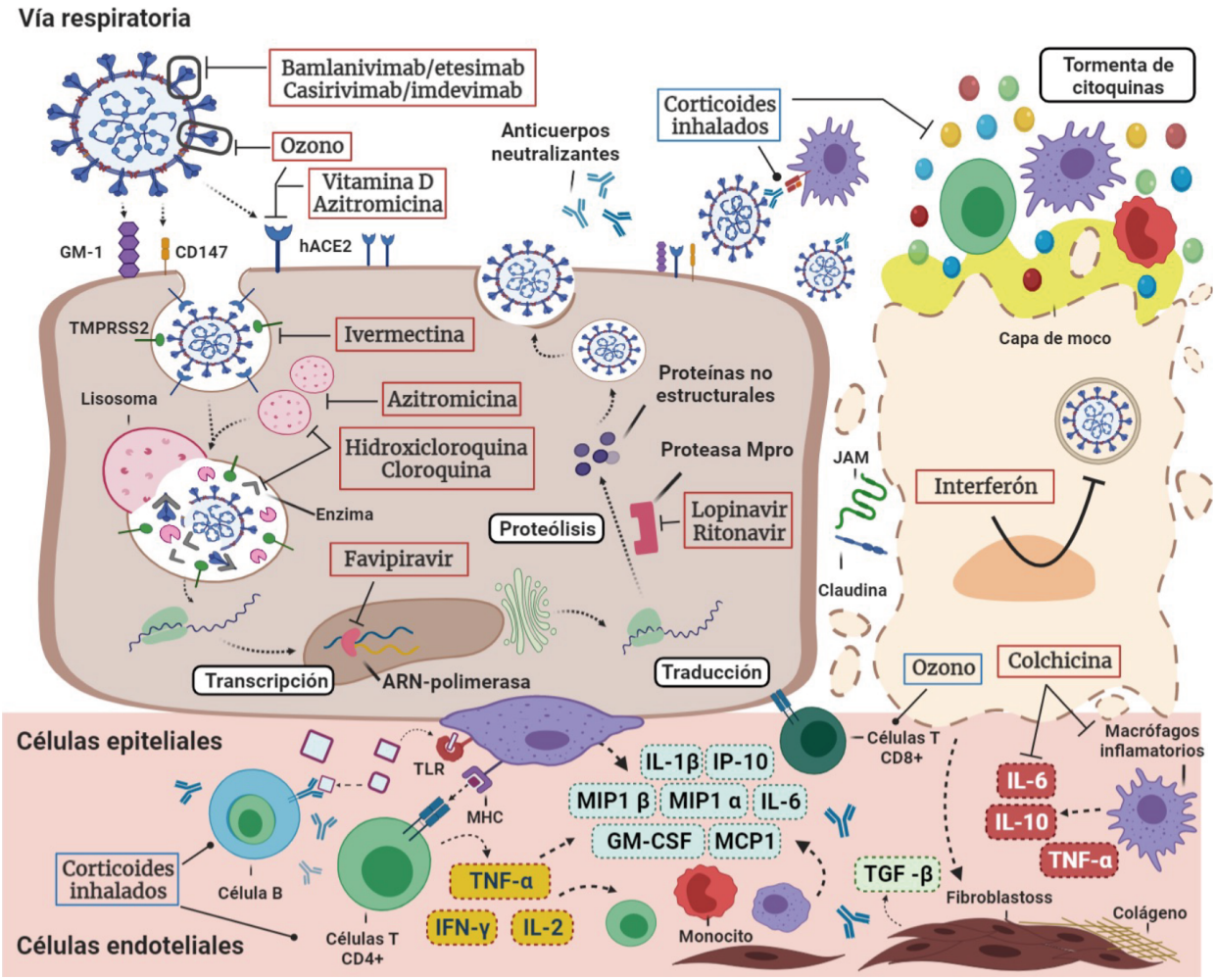


Figura 1. Mecanismo de acción de los diferentes fármacos

2. BAMLANIVIMAB / ETESIVIMAB

En 2021, con la aparición de las vacunas frente al SARS-CoV-2 como principal método preventivo, otras moléculas fueron desarrolladas también en el ámbito de la inmunoterapia. La proteína *spike* del virus se convirtió en una de las principales dianas para el desarrollo de moléculas y, en este contexto, se sintetizaron anticuerpos monoclonales neutralizantes, proteínas recombinantes que aportan inmunidad pasiva para reducir la virulencia del virus (Nathan *et al.* 2021).

Bamlanivimab fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado para tratar la COVID-19 y, más tarde, se combinó con un segundo anticuerpo monoclonal, etesevimab (Nahan *et al.* 2021). Ambos son anticuerpos monoclonales neutralizantes de la inmunoglobulina G1 y su mecanismo de acción es mediante la unión a distintos epítopos del dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína *spike* minimizando, de esta forma, la aparición potencial de variantes resistentes emergentes del tratamiento (Baum *et al.* 2020).

La administración es por vía endovenosa y se metabolizan por proteasas en varias localizaciones del organismo, al igual que los anticuerpos IgG (Administration 2019). La pauta habitual es de 700 mg de bamlanivimab y 1400 mg de etesevimab en una infusión única (Administration 2019). No se han descrito interacciones debido a que no se eliminan por vía renal ni se metabolizan por las enzimas del citocromo CYP450 (Administration 2019).

Los efectos adversos más habituales son reacciones infusionales, náuseas y diarrea (Gottlieb *et al.* 2021).

Su rápido desarrollo fue llevado a cabo en el ECA fase 2/3 BLAZE-1, multicéntrico, en pacientes con infección por SARS-CoV-1 y, al menos, un síntoma leve o moderado presente en los primeros 3 días desde la prueba positiva. Se excluyeron pacientes hospitalizados. El ECA tuvo dos etapas, en la primera se comparaba bamlanivimab frente a placebo y, en la segunda, bamlanivimab/etesevimab frente a placebo. Bamlanivimab fue administrado a diferentes dosis (700 mg, 2800 mg o 7000 mg) mediante una infusión única, mientras que la combinación

se administró a dosis de 2800 mg de bamlanivimab y 2800 mg de etesevimab. La variable principal fue la variación en el logaritmo de la carga viral del SARS-CoV-2 en el día 11. Solo se observaron diferencias significativas en la carga viral en los pacientes en tratamiento con la combinación de bamlanivimab/etesevimab (-0.57; P = 0,01) (Gottlieb *et al.* 2021).

Estudios en vida real han demostrado que bamlanivimab redujo hospitalizaciones y mortalidad, especialmente en pacientes de ≥ 65 años (Webb *et al.* 2021; Bariola *et al.* 2021). Bamlanivimab/etesevimab también redujo el riesgo de progresar a COVID-19 severa, el número de ingresos y los requerimientos de oxígeno (Cooper *et al.* 2021; Vena *et al.* 2021).

Sin embargo, bamlanivimab/etesevimab no se encuentra recomendado actualmente en las guías (Bhimraj *et al.* 2022). La principal razón es su eficacia limitada frente a las variantes Beta y Gamma, y la ausencia de actividad frente a la variante Ómicron BA.1 y BA.2 (Bhimraj *et al.* 2022; Doggrell 2021). La combinación bamlanivimab/etesevimab fue evaluada en pacientes infectados por las variantes resistentes del SARS-CoV-2 Alpha y Gamma (Falcone *et al.* 2021), donde demostraron un mayor número de hospitalizaciones o muerte a los 30 días en comparación con los pacientes en tratamiento con casirivimab/imdevimab (Falcone *et al.* 2021). Otras limitaciones incluyen que en el ECA BLAZE-1 se estudió la variación de la carga viral en el día 11, cuando está comprobado que la respuesta inmunitaria no es la misma que en los primeros días de infección y la carga viral ya ha disminuido bastante, por lo que no tenemos información de cómo varía la carga viral en los primeros días de infección, ya que los estudios en vida real no lo incluyen como variable. Además, la reducción de síntomas en el grupo placebo en el día 11 hace difícil determinar si el anticuerpo monoclonal fue efectivo reduciendo síntomas. Otras limitaciones son que el tamaño muestral es reducido y la mayoría de los pacientes que recibieron la combinación de bamlanivimab/etesevimab lo hicieron a dosis más altas a las recomendadas por la ficha técnica.

No hay datos en pacientes hospitalizados ni que requieran oxígeno, por lo que su aplicabilidad en la práctica clínica es reducida. La aplicabilidad en pacientes ambulatorios también es complicada debido a la necesidad de ser administrados en un hospital con el potencial riesgo de infección que eso supone, de especial preocupación en pacientes de alto riesgo, o de crear una unidad COVID domiciliaria específica para ello (Bavaro *et al.* 2022). Además, ante la dificultad en muchos casos de testar la variante del SARS-CoV-2 que tiene cada paciente, el riesgo de que no sea efectivo para algunos pacientes es elevado.

3. CASIRIVIMAB / IMDEVIMAB

La combinación de los anticuerpos casirivimab/imdevimab actualmente no se encuentra aprobada en el estado español. En Estados Unidos, se encuentra aprobado para las siguientes situaciones:

— Profilaxis post exposición en personas de riesgo elevado de progresión a enfermedad grave, incluyendo hospitalización o muerte, y que no disponen de la pauta completa de vacunación o bien no se espera que puedan presentar una respuesta inmunitaria adecuada a la vacunación (pacientes con inmunosupresión, incluyendo el tratamiento con fármacos inmunosupresores) (EMA 2021; Food and Drug Administration 2022).
— Tratamiento de la infección leve a moderada por COVID-19 en pacientes de riesgo elevado de progresión a enfermedad grave, incluyendo hospitalización o muerte, y que presentan un resultado positivo del test viral directo de SARS-CoV-2 (Food and Drug Administration 2022).

La administración de casirivimab/imdevimab puede asociarse a un peor resultado clínico cuando se administra a pacientes hospitalizados con infección por COVID-19 que requieren oxigenoterapia de alto flujo o ventilación mecánica. Por tanto, la administración de estos anticuerpos no está indicada en pacientes hospitalizados por COVID-19 o que requieren terapia con oxígeno a causa de la infección por COVID-19 o aumento del flujo de la misma en pacientes ya en tratamiento con ésta por una patología diferente al COVID-19 (Food and Drug Administration 2022). La dosis recomendada varía en función de la indicación, en el caso de profilaxis post exposición se recomienda dosis única de casirivimab 600 mg e imdevimab 600 mg tan pronto como sea posible tras la exposición al SARS-CoV-2.

En personas con exposición continuada al SARS-CoV-2 (durante más de 4 semanas) y que no presenten una respuesta inmunitaria adecuada a la vacunación se puede repetir una dosis de casirivimab 300 mg e imdevimab 300 mg cada 4 semanas durante el tiempo que dure la exposición (53). En el caso de la infección leve a moderada, se recomienda una dosis única de casirivimab 600 mg e imdevimab 600 mg tan pronto como sea posible después de un test positivo para SARS-CoV-2 y durante los 10 primeros días tras la instauración de los síntomas (Food and Drug Administration 2022).

Para la profilaxis post exposición el fármaco se puede administrar tanto en infusión intravenosa como por vía subcutánea. Para el tratamiento se recomienda la administración en infusión intravenosa, reservando la vía subcutánea únicamente en aquellos casos en los que la no

disponibilidad de acceso intravenoso conduciría a un retraso en el inicio del tratamiento.

Casirivimab/imdevimab son anticuerpos monoclonales recombinantes humanos (IgG1κ and IgG1δ, respectivamente). Se unen a epítopos del RBD de la proteína espícula del virus, bloqueando su unión a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de la célula huésped (Food and Drug Administration 2022).

No experimentan eliminación por vía renal debido a que presentan un peso molecular elevado (Food and Drug Administration 2022). No se disponen de datos en pacientes con insuficiencia hepática.

Se han reportado efectos adversos en el lugar de inyección en más del 10% de los pacientes (equimosis, eritema, prurito...). Otros efectos adversos observados con menor frecuencia son náuseas y vómitos (1-10%), y reacciones de hipersensibilidad, reacciones relacionadas con la infusión y deterioro físico del estado de salud (<1%) (Food and Drug Administration 2022).

En el caso de la post exposición, uno de los principales ECA evaluó si la administración subcutánea de casirivimab/imdevimab 1.200 mg fue eficaz en la prevención de la infección por COVID-19 en personas de alto riesgo por tratarse de contactos estrechos de pacientes infectados en domicilio (O'Brien *et al.* 2021). El desarrollo global de la infección sintomática por COVID-19 se observó en 11 (1,5%) pacientes que recibieron los anticuerpos monoclonales frente a 59 (7,8%) pacientes que recibieron placebo (RRR 81,4%; OR 0,17 (IC95%: 0,09-0,33); p< 0,001).

Estas diferencias se mantuvieron de forma independiente a la definición utilizada de infección sintomática por COVID-19, en pacientes con riesgo elevado de progresión a infección grave o en función del estado serológico de los sujetos incluidos.

En el tratamiento, el ECA RECOVERY demostró que casirivimab/imdevimab redujo la mortalidad a los 28 días de manera estadísticamente significativa en aquellos pacientes hospitalizados con infección por COVID-19 seronegativos que recibieron frente al tratamiento estándar (24% vs. 30%; riesgo relativo [RR] 0,79; intervalo de confianza 95% [IC95%]: 0,69-0,91; P = 0,0009) (Abani *et al.* 2022). No obstante, estas diferencias no se observaron en el análisis del total de pacientes aleatorizados, independientemente de su estado serológico (19% vs. 21%; RR 0,94; IC95%: 0,86-1,02; P = 0,14).

A pesar de la eficacia mostrada en los ECA, la actividad de estos anticuerpos monoclonales se ha visto comprometida ante la emergencia posterior de la variante Ómicron (B.1.1.529) y sus subvariantes (B.1.1.529, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 and BA.5), por la reducida sensibilidad que muestran (CDC 2022). Actualmente estas cepas son dominantes y consideradas las variantes de preocupación o de interés, por lo que las guías no recomiendan la administración de casirivimab/imdevimab en profilaxis post exposición o en tratamiento de la infección por COVID-19 (38,40). Estas recomendaciones no son estáticas, sino que pueden variar en función de las cepas de COVID-19 mayoritarias y su sensibilidad a la asociación de anticuerpos monoclonales.

4. CLOROQUINA / HIDROXICLOROQUINA

La cloroquina (CQ) y la hidroxicloroquina (HCQ) se utilizan para el tratamiento y la prevención de la malaria y en el tratamiento de enfermedades inflamatorias reumatológicas, como el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide.

Se cree que el mecanismo de acción en la malaria resulta de la inhibición de la biocristalización de la hemozoína, causando una acumulación citotóxica del grupo hemo (Schrezenmeier y Dörner 2020). En el caso de las enfermedades reumatológicas, el mecanismo de acción no está del todo dilucidado, pero parece estar relacionado con múltiples efectos. Al tratarse de bases débiles, tanto la CQ como la HCQ se acumulan en el entorno ácido de los lisosomas, interfiriendo en la actividad lisosomal y la autofagia, lo que a su vez puede inhibir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y la presentación de antígenos, inhibiendo la activación inmunológica (Schresenmeier y Dörner 2020). También interfieren con la señalización del receptor tipo Toll que estimula la producción de citoquinas y reducen la expresión de la molécula CD154 en las células T. Se ha demostrado que inhiben la producción de la interleucina (IL)-1, la IL-6, el factor de necrosis tumoral y el interferón gamma. También se han descrito efectos sobre las células dendríticas, las células B y otras células presentadoras de antígenos (dos Reis Neto *et al.* 2020).

Las dosis habituales de CQ son de 250-500 mg de CQ fosfato por dosis, o sulfato de CQ 200 mg con una dosis semanal para la profilaxis de la malaria y una dosis diaria para el tratamiento de la malaria y las enfermedades reumatológicas. La HCQ se administra a una dosis de 400 mg semanales para la profilaxis del paludismo, y de 200-400 mg diarios para la enfermedad reumatológica (Ben-Zvi *et al.* 2012).

La HCQ y la CQ son sustratos de las enzimas del citocromo P450, por tanto, ambos pueden presentar potenciales interacciones clínicamente relevantes. Debe prestarse especial atención a la administración concomitante con otros fármacos como los macrólidos y las quinolonas, entre otros, ya que también pueden provocar un aumento del intervalo QT (Schrezenmeier y Dörner 2020).

La HCQ y la CQ tienen propiedades farmacocinéticas similares, con alta biodisponibilidad oral y penetración

tisular, metabolismo hepático parcial, y elevados volúmenes de distribución y vida media. Sin embargo, algunas de las propiedades farmacocinéticas de la HCQ y la CQ como las tasas de aclaramiento renal difieren notablemente (Schrezenmeier y Dörner 2020).

La HCQ y la CQ son medicamentos relativamente seguros. Los efectos adversos más frecuentes incluyen síntomas gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarrea y malestar abdominal), prurito y reacciones dermatológicas. Sin embargo, la complicación más grave es el desarrollo de retinopatía irreversible.

El efecto antiviral de la HCQ y la CQ consiste en que pueden afectar a las vesículas ácidas e inhibir varias enzimas, lo que les permite inhibir la entrada viral a la célula cuando la endocitosis es dependiente del pH. También inhiben la glicosilación viral, las modificaciones postraduccionales y la replicación de algunas familias virales. Se ha demostrado además que la CQ podría inhibir la quinona reductasa-2, enzima implicada en la síntesis del ácido siálico, presente en la ACE2, receptor de entrada celular del SARS-CoV-2.

Vincent *et al.* demostraron que las células pretratadas con CQ eran refractarias al virus y revelaban una alteración de la glicosilación terminal del receptor ACE2, disminuyendo la afinidad del receptor viral y, por tanto, reduciendo el inicio de la infección (Vincent *et al.* 2005). Esta hipótesis avalaba la posibilidad de utilizar la HCQ como profilaxis del coronavirus.

Además de su papel antiviral, la CQ e HCQ podría presentar una acción inmunomoduladora de interés en el tratamiento de la COVID-19.

En base a evidencia *in vitro* (Liu *et al.* 2020; Yao *et al.* 2020; Wang *et al.* 2020), y considerando la hipótesis de que podían ser útiles en la prevención y tratamiento del SARS-CoV-2, la CQ y HCQ se consideraron como parte de la profilaxis y del tratamiento estándar para los pacientes con COVID-19, especialmente durante la primera fase de la pandemia. Se publicaron series de casos, estudios observacionales y ensayos abiertos no aleatorizados (Selvarajan *et al.* 2022; Cavalcanti *et al.* 2020) que demostraron un posible beneficio clínico. Sin embargo, este entusiasmo se ha venido abajo con la publicación de los resultados de ECA. Estos concluyen en que el uso de HCQ no muestra beneficio clínico en pacientes hospitalizados con COVID-19 de leve a moderada en comparación con el tratamiento estándar (Cavalcanti *et al.* 2020; Tang *et al.* 2019) y tampoco ha demostrado ser eficaz en la reducción de los síntomas en pacientes ambulatorios con infección leve (Skipper *et al.* 2020). La información disponible en la prevención del ingreso hospitalario en pacientes ambulatorios, así como la profilaxis en personas expuestas al SARS-CoV-2 es incierta, sin embargo, dada la falta de beneficio en pacientes hospitalizados, y la limitada evidencia disponible, el beneficio del tratamiento en estos pacientes parece poco probable (Selvarajan *et al.* 2022; Singh *et al.* 2021).

Además, tres estudios tuvieron que interrumpir el reclutamiento debido a la falta de eficacia de la HCQ en comparación con el brazo de control en los análisis preliminares (Recovery 2020; World Health Organization 2020; National Institutes of Health 2020) y un artículo publicado fue retractado (Mehra *et al.* 2020).

A la ausencia de beneficio clínico se suman ciertos problemas de seguridad basados principalmente en el análisis de un estudio de fase IIb que informó de una tendencia hacia una mortalidad cardiovascular en los pacientes que recibieron dosis elevadas de CQ (Borba *et al.* 2020), así como de la resolución de la Food and Drug Administration (FDA) advirtiendo en contra del uso de la HCQ y de la CQ para el tratamiento del COVID-19 fuera del entorno hospitalario o de un ECA debido al riesgo de problemas con el ritmo cardíaco.

En conclusión, la evidencia disponible muestra que ni la CQ ni la HCQ deberían utilizarse para la prevención o el tratamiento de la COVID-19, basándose en la falta de beneficios clínicos y problemas de seguridad.

5. COLCHICINA

La colchicina está indicada en las siguientes situaciones clínicas (Ficha Técnica Colchicina 2022):

Tratamiento de ataques agudos de gota y de la gota crónica, profilaxis de ataques agudos por inicio del tratamiento con movilizadores del ácido úrico; fiebre mediterránea familiar; tratamiento en adultos de la pericarditis aguda y pericarditis recurrente en combinación con ácido acetilsalicílico u otros antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Se trata de un fármaco que presenta un índice terapéutico estrecho, por lo que su acumulación puede asociarse a consecuencias clínicas graves, incluso fatales.

La dosis recomendada oscila entre 0,5 mg y 2 mg al día por vía oral, en función de la indicación.

Su mecanismo no es completamente conocido (Ficha Técnica Colchicina 2022). Produce una interrupción de las funciones del citoesqueleto al inhibir la polimerización de la β-tubulina en microtúbulos, evitando la activación, desgranulación y migración de neutrófilos asociados con la mediación de algunos síntomas de gota.

En la fiebre mediterránea familiar, puede interferir con el ensamblaje intracelular del complejo inflamasoma presente en los neutrófilos y monocitos que median la activación de la interleucina-1β.

La colchicina se excreta en orina entre un 40 % y un 65 % como fármaco inalterado (Ficha Técnica Colchicina 2022). Así, los pacientes con enfermedad renal terminal

presentan una reducción del aclaramiento del 75 % y una prolongación de la semivida plasmática del fármaco.

Sufre metabolismo hepático vía CYP3A4 y glucuronidación. En el caso de cirrosis hepática de leve a moderada también se observa una reducción del aclaramiento y prolongación de su semivida plasmática.

Se han observado efectos adversos gastrointestinales en más del 10 % de los pacientes (náuseas, vómitos, diarrea [23 %]) (Ficha Técnica Colchicina 2022). Los síntomas generalmente se resuelven rápido tras la reducción de la dosis o discontinuación del tratamiento.

Otros efectos adversos observados con menor frecuencia son efectos adversos hematológicos (anemia aplásica, depresión de la médula ósea, granulocitopenia, trombocitopenia...), sistema nervioso (miastenia, neuropatía...), sistema neuromuscular (mialgia, miopatía...).

En la infección por COVID-19 el grado de activación del inflamasoma, específicamente el inflamasoma NLRP3, se correlaciona con la gravedad de la patología (Rodrigues *et al.* 2020).

El mecanismo antiinflamatorio de la colchicina, incluyendo la inhibición del inflamasoma NLRP3, llevó a la consideración de que este fármaco podría constituir una opción terapéutica en el manejo de la fase inflamatoria de la infección por COVID-19 (Reyes *et al.* 2021).

No obstante, la evidencia disponible no ha mostrado un beneficio del tratamiento con colchicina de esta patología, además de una tasa superior de eventos adversos, por lo que las principales guías de tratamiento recomiendan en contra de su utilización en el tratamiento de la infección por COVID-19 en pacientes tanto hospitalizados como en aquellos que no requirieron ingreso hospitalario (Bhimraj *et al.* 2022, IDSA 2022).

En pacientes hospitalizados la mayor evidencia procede del ECA RECOVERY, dado el elevado número de pacientes aleatorizados a recibir tratamiento con colchicina o placebo, 5.610 frente a 5.730, respectivamente (Colchicine 2021). No se observaron diferencias en la mortalidad a los 28 días ni en otras variables secundarias evaluadas.

En pacientes que no requirieron hospitalización los ensayos PRINCIPLE y COLCORONA aportaron la mayor evidencia asociada a la recomendación en contra del tratamiento con colchicina en la infección por COVID-19 (Dorward *et al.* 2022; Tardif *et al.* 2021). En el estudio PRINCIPLE no se observaron diferencias en el número de días hasta la recuperación entre ambos grupos de tratamiento. En el estudio COLCORONA se observó una modesta reducción en la variable compuesta por mortalidad u hospitalización del 1,1 % en el grupo de pacientes asignados al tratamiento con colchicina frente a placebo, y del 1,4 % en el subgrupo de pacientes que dispusieron de confirmación por PCR, respectivamente. Además de este beneficio limitado, se reportaron eventos adversos graves en el grupo que recibió colchicina frente a placebo en 108 (4,9 %) de 2.195 pacientes y 139 (6,3 %) de 2.217 pacientes, respectivamente (p = 0,051); neumonía en 63 (2,9 %) y 92 (4,1 %), respectivamente (p = 0,021); diarrea en 300 (13,7 %) y 161 (7,3 %), respectivamente (p <0,0001).

6. CORTICOSTEROIDES INHALADOS

Los glucocorticoides (GC) inhalados están indicados para el tratamiento de enfermedades respiratorias inflamatorias en la práctica habitual (FRCP 2018).

El mecanismo de acción se basa en la unión del glucocorticoide a unos receptores específicos situados en el epitelio o endotelio de la vía área. Por difusión pasiva, entran en el citoplasma, donde se encuentra el receptor glucocorticoide (RG), se unen a este y forman el complejo GC-RG, que rápidamente migrará al núcleo. Aquí, se inhibe la transcripción de genes codificadores de proteínas inflamatorias (Rodríguez-Orozco *et al.* 2010).

La potencia de cada GC depende de su afinidad por el RG. Y su efecto terapéutico varía según el grado de depósito pulmonar, cantidad de fármaco que se quedará en el pulmón y ejercerá su acción local (Daley-Yates 2015).

Existen diferentes dosis de GC inhalados, se suelen clasificar en dosis bajas, medias o altas. Según la indicación, potencia del GC y gravedad de la enfermedad, se usará una posología diferente (Daley-Yates 2015). Se estima que solo entre el 10-40 % de la dosis administrada es inhalada (FRCP 2018).

Algunos de los efectos adversos relacionados con los GC inhalados son: disfonía, candidiasis oral y esofágica, desmineralización ósea, glaucoma, hiperglucemia, supresión del eje suprarrenal, etc. Su gravedad varía, y en algunos, la tasa de frecuencia de aparición es baja (Daley-Yates 2015).

En el COVID-19, el posible efecto de los GC inhalados frente al SARS-CoV-2, podría deberse a la modificación de la excesiva respuesta inmunitaria. Con ello, se reconduciría a una respuesta inmunitaria controlada, con activación de células B, T y citotoxicidad mediada por anticuerpos; y se evitaría la liberación masiva y no controlada de citoquinas (Felicity Liew PJMO 2021).

La administración de budesónida inhalada varía el perfil inflamatorio de la mucosa nasal y del plasma (Baker *et al.* 2022). A diferencia de los corticoides orales, que actúan como inmunosupresores, los GC inhalados mantienen una respuesta viral debida a su acción moduladora sobre la inflamación. De este modo se consigue un menor daño epitelial y una respuesta adecuada de las células T.

En cultivos celulares, se ha demostrado que los corticoides inhalados son capaces de suprimir específicamente

la replicación de diferentes coronavirus. De este modo, los GC inhalados podrían ser una opción terapéutica del COVID-19 (Matsuyama *et al.* 2020).

El ECA PRINCIPLE (Yu *et al.* 2021) evaluó el uso de budesónida en pacientes graves COVID-19 no ingresados. La posología fue 800 µg/12 h durante 14 días. Se obtuvo que con el tratamiento se reducía el tiempo de recuperación en estos pacientes. No hubo ningún efecto adverso grave durante el ensayo. Finalmente, concluían que podría ser una opción terapéutica en pacientes con riesgo de complicación. En la misma línea de pacientes y tratamiento, en el estudio STOIC (Ramakrishnan *et al.* 2021) se demostró que los pacientes tratados con GC inhalados acudían menos a urgencias. Por el contrario, en el estudio CONTAIN (Ezer *et al.* 2021) no se mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa en la resolución de síntomas con la administración de ciclesonida.

Otro ECA realizado en pacientes hospitalizados estudió el impacto de budesónida inhalada (400 µg/12 h) (Agusti *et al.* 2022). Los resultados sugerían que el tratamiento era seguro y que existía una tendencia a la reducción de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, el estudio se suspendió prematuramente.

Por otro lado, en otro estudio se evaluó la mortalidad y la no necesidad de ventilación en pacientes críticos en tratamiento con GC inhalado (Al Sulaiman *et al.* 2022). Se administraron diferentes corticoides y se usaron diferentes vías de administración (inhalada y nebulizada). Se observó que había una reducción estadísticamente significativa en la mortalidad a los 30 días. En cambio, la mortalidad intrahospitalaria fue similar en ambos grupos, tratamiento y control. No hubo asociación entre el tratamiento y la no necesidad de ventilación.

Otras hipótesis incluyeron que la eosinofilia podría ser un factor de buen pronóstico para eliminar el SARS-CoV-2 por la capacidad antiviral de estas células defensoras. Sin embargo, en otro trabajo se demostró que el efecto de mejoría de los síntomas se veía en pacientes con eosinofilia alta y en tratamiento con GC inhalados (Zein *et al.* 2022). Por lo tanto, la eosinofilia podría ser un marcador de respuesta al tratamiento de GC inhalados en pacientes COVID-19.

Las últimas guías europeas del COVID-19 (Bartoletti *et al.* 2022) determinan que no hay suficiente evidencia para recomendar los GC inhalados como opción terapéutica de elección en el COVID-19.

7. FAVIPIRAVIR

Favipiravir es un fármaco antiviral que, en 2014, fue aprobado en Japón para tratar casos de influenza que no responden al tratamiento convencional. No está aprobado por la EMA ni la FDA.

Se trata de un análogo nucleótido de la guanosina purina que se metaboliza intracelularmente a su metabolito activo ribofuranosil-5'-trifosfato. Este metabolito es un potente inhibidor del RNA dependiente de la RNA-polimerasa (RdRp) de los virus e induce mutagénesis letal (Simsek-Yavuz *et al.* 2021).

La farmacocinética de favipiravir es compleja, no lineal, tiempo y dosis dependiente, y se ve afectada por el peso (Hayden y Sindo 2019). Su biodisponibilidad por vía oral es del 97,6 % siendo preferible administrarlo sin alimentos (Hayden y Sindo 2019). Se une a proteínas plasmáticas un 54 % y se elimina principalmente por vía renal (Hayden y Sindo 2019). La semivida de eliminación se estima que es entre 2 y 5,5 horas (Hayden y Sindo 2019). Es un inhibidor débil del CYP2C8, por lo que podría aumentar los niveles plasmáticos de fármacos metabolizados por esta vía, como la repaglinida (Hayden y Sindo 2019). Además, podría incrementar las concentraciones de ácido úrico si se administra de forma concomitante con otros fármacos que también lo incrementan, como la pirazinamida (Hayden y Sindo 2019).

La pauta habitual empleada en adultos con influenza es 1600 mg/12 h en el día 1, seguido de 600 mg/12 h los días 2 al 5 (Hayden y Sindo 2019).

La evidencia sobre sus efectos adversos es limitada pero se han descrito casos de dolor torácico (Ivashchenko *et al.* 2021), hiperuricemia (Sanders *et al.* 2020), disminución del apetito (97), diarrea (Ivashchenko *et al.* 2021; Sanders *et al.* 2020), náuseas (Ivaschenko *et al.* 2021), vómitos (Ivashchenko *et al.* 2021), disminución del recuento de neutrófilos (Sanders *et al.* 2020), hepatotoxicidad (Cai *et al.* 2020) y aumento de las enzimas hepáticas (Ivashchenko *et al.* 2021; Sanders *et al.* 2020).

Favipiravir demostró actividad frente a un amplio espectro de virus que incluye influenza, arenavirus, bunyavirus y flavivirus, debido a que el dominio catalítico del RdRp se cree que es similar a otros virus de RNA (Simsek-Yavoz *et al.* 2021; Furuta *et al.* 2017). Por tanto, se pensó que potencialmente podría presentar también actividad frente a otro virus RNA, como el SARS-CoV-2. La EC50 para el SARS-CoV-2 fue testada *in vitro* en células Vero E6 siendo de 61,88 µM (Wang *et al.* 2020), mucho mayor a la observada en influenza (Furuta *et al.* 2017) o en el virus del Ébola (Oesterreich *et al.* 2014). Esto indica que la dosis empleada para la COVID-19 tendría que ser mayor a la recomendada en influenza, y se ha estimado que podría ser 1800 mg/12 h en el día 1, seguido de 800 mg/12 h los días 2 al 5, pero no hay un consenso claro al respecto (Joshi *et al.* 2021).

El posible mecanismo de acción frente al SARS-CoV-2 es una combinación entre su actividad como reactivo de terminación de cadena, reducción de la síntesis de RNA y mutagénesis letal *in vitro* (Simsek-Yavuz *et al.* 2021).

En un estudio antes-después realizado en China, se compararon dos grupos de pacientes en tratamiento con favipiravir a la dosis habitual registrada en ficha técnica e interferón-alfa (n = 35) frente a otro grupo en tratamiento con lopinavir/ritonavir e interferón-alfa (n = 45). Se concluyó que favipiravir proporcionaba una mayor mejora en la tomografía computarizada a partir del día 14, mayor aclaramiento viral (4 días vs. 11 días) y menores efectos adversos (4 [11,4 %] vs. 25 [55,6 %]; p<0,001). Otro ECA, comparó favipiravir frente a albidol en pacientes 1:1. No se observó un aumento en la mejora clínica en el día 7 en el grupo de favipiravir ni se observaron diferencias significativas en la oxigenoterapia auxiliar ni la ventilación mecánica no invasiva (Chen *et al.* 2021).

El resto de ECA publicados tampoco ha demostrado beneficios claros de favipiravir en la COVID-19, como se muestra en una revisión publicada en 2021 (Srinivasan y Rao 2021). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) está llevando a cabo dos ensayos, PRINCIPLE y PRESECO, evaluando la utilidad de favipiravir frente al SARS-CoV-2.

La evidencia disponible no demuestra que favipiravir pueda ser un fármaco de elección para la COVID-19.

8. FLUVOXAMINA

Se trata de un antidepresivo que actúa mediante la inhibición de la recaptación de serotonina (Edinoff *et al.* 2021). A pesar de coincidir con otros fármacos que actúan de forma similar, fluvoxamina se utiliza en pacientes con alteraciones obsesivas-compulsivas. Se dispone de datos que muestras que, a finales de 1995, más de 10 millones de pacientes habían sido tratados con este antidepresivo.

Las dosis habitualmente recomendadas son de 100-300 mg al día, en función de la indicación médica (Ficha Técnica Fluvoxamina 2022). Este medicamento puede interaccionar con otros dado que puede inhibir diversos citocromos, especialmente CYPA12 y CYP2C19 (Ficha Técnica Fluvosamina 2022). Dentro de los efectos adversos más frecuentes se encuentran la anorexia, agitación, ansiedad, mareos, palpitaciones, taquicardia, dolor abdominal, hiperhidrosis o astenia (Ficha Técnica Fluvoxamina 2022). Su eliminación no presenta alteraciones en la insuficiencia renal, mientras que se recomienda precaución en la insuficiencia hepática (Ficha Técnica Fluvoxamina 2022).

La fluvoxamina se postuló como un potencial fármaco para tratar la COVID-19 en base a sus propiedades antivirales y antiinflamatorias. Los mecanismos de acción son diversos e incluyen: captación reducida de serotonina por las plaquetas, reducción de la liberación de histamina por los mastocitos, efectos lisosomotróficos que interfieren en el ciclo viral, agonismo con S1R y efectos en la inflamación mediada por IRE-1 y aumento de los niveles de melatonina (Sukhatme *et al.* 2021).

Algunas revisiones sobre fármacos antidepresivos y su actividad frente a la COVID-19 han propuesto la realización de ECA con fluvoxamina para confirmar su potencial actividad en esta infección (Mas *et al.* 2022). De hecho, un ECA, controlado frente a placebo, efectuado en Brasil, en el que se pretendía incluir 9.803 pacientes, demostró que el tratamiento con fluvoxamina en dosis de 100 mg cada 12 h durante 10 días, administrado a pacientes de alto riesgo con diagnóstico precoz de COVID-19, reducía la necesidad de hospitalización de los pacientes, definida como la necesidad de atención prolongada en una unidad de urgencias o de traslado a un hospital terciario (Reis *et al.* 2022). De hecho, debido a los resultados de un análisis intermedio en el que se observó la superioridad del antidepresivo frente a placebo, se decidió finalizar el estudio cuando se había incluido 741 pacientes en el grupo con fármaco activo frente a 756 en el de placebo. En el momento de finalización del estudio, un análisis estadístico bayesiano mostró una probabilidad de superioridad del 99,8 % en los resultados frente al umbral preestablecido del 97,6 %.

Estos resultados coinciden con resultados positivos observados en una revisión previa en la que, sin embargo, la disminución de la hospitalización no pudo demostrarse (Guo *et al.* 2022).

En mayo 2022, la FDA denegó la autorización de este antidepresivo en el tratamiento de la COVID-19 mediante el argumento que cuestiona el beneficio potencial observado en el ECA mencionado con un bajo coste de este fármaco para prevenir hospitalizaciones y muertes por esta infección. El motivo principal para dicha denegación se basó en que el estudio generaba incertidumbres sobre cuál era el umbral clínicamente beneficioso al haberse realizado el seguimiento de los pacientes del ECA con una duración máxima de 6 horas (Memorandum 2022). De hecho, este posicionamiento terapéutico ha quedado ratificado por la OMS, organización que recomienda la no utilización de fluvoxamina salvo en el contexto de los ECA (WHO Clinical Management 2021). En el último ECA, la utilización de fluvoxamina no se asoció con ningún beneficio clínico en el objetivo primario (hipoxemia, visita a urgencias, hospitalización o muerte), con un Odds Ratio 0,94 (IC 95 % 0,66-1,36, P = 0,75) (Bramante *et al.* 2022).

9. INTERFERÓN

Los distintos interferones presentan las siguientes indicaciones clínicas:

Interferón beta-1.ª: Indicado en esclerosis múltiple recidivante y en esclerosis múltiple en brotes.

Interferón beta-1B: Indicado en esclerosis múltiple remitente-recidivante y en esclerosis múltiple secundaria progresiva que presenta enfermedad activa.

Peginterferón lambda (medicamento huérfano): Indicado en la hepatitis por el virus Delta.

La posología de interferón beta-1A o beta 1-B en esclerosis múltiple es variable y depende de la presentación administrada. Peginterferón lambda se administra a dosis de 180 mcg semanales.

La unión del interferón beta a sus receptores inicia una compleja cascada de eventos intracelulares que conduce a la expresión de diversos productos y marcadores inducidos genéticamente por el interferón. Entre ellos se incluyen la 2'/5'-oligoadenilato sintetasa (enzima implicada en la supresión viral), la β2-microglobulina y la neopterina (producto de macrófagos activados y células T) (Ficha Técnica Extavia 2022). Estos marcadores reflejan una variedad de actividades biológicas que incluyen efectos antivirales, inmunomoduladores, antineoplásicos y antiinflamatorios.

Su mecanismo de acción en la esclerosis múltiple no ha sido completamente identificado, aunque pueden estar implicados los efectos inmunomoduladores y la actividad antiinflamatoria.

No se dispone de recomendaciones sobre ajuste de posología en insuficiencia renal o hepática, aunque se recomienda precaución en enfermedad hepática activa, abuso de alcohol, aumento de ALT de 2,5 veces por encima del límite superior de normalidad o historia de enfermedad hepática significativa (Ficha Técnica Extavia 2022).

Los efectos reportados en más del 10% de pacientes que han recibido tratamiento con interferón beta-1A o 1B son efectos gastrointestinales, infección del tracto urinario, toxicidad hematológica, elevación de las transaminasas, neutralización por desarrollo de anticuerpos frente al fármaco, efectos a nivel del sistema nervioso central (escalofríos, depresión, vértigo, fatiga, cefalea, insomnio), efectos en el lugar de la inyección, astenia, mialgia, dolor de espalda, alteración visual, síntomas gripales, sinusitis, infección del tracto respiratorio inferior y fiebre (Ficha Técnica Extavia 2022).

La actividad antiviral asociada a interferón ha motivado su administración en el tratamiento de la hepatitis B y C, así como su evaluación en la infección por COVID-19 (COVID-19 Treatment Guidelines 2022).

A pesar de que algunos estudios han podido identificar un efecto positivo asociado a interferón (Alavi Darazam *et al.* 2021; Hung *et al.* 2020; Rahmani *et al.* 2020), se ha de considerar el tamaño reducido de la muestra incluida en estos ensayos, así como la evaluación de la administración de interferón habitualmente asociada a otros tratamientos.

Ensayos llevados a cabo en un mayor número de pacientes no han logrado hallar un beneficio clínico asociado a este tratamiento (WHO Solidarity 2021; Kalil *et al.* 2021). La mayor evidencia proviene del ensayo WHO SOLIDARITY (2021), el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto del tratamiento con remdesivir, hidroxicloroquina, lopinavir/ritonavir o interferón beta-1A en la mortalidad durante el ingreso hospitalario. En el grupo de pacientes que recibieron interferón beta-1A se permitió el tratamiento concomitante con lopinavir/ritonavir hasta principios de julio de 2020, de acuerdo con la práctica clínica. La mortalidad intrahospitalaria fue del 11,8% en el grupo interferón beta-1A frente al 10,5% en el grupo control (RR 1,16; IC95%: 0,96-1,39; P = 0,11). Estos resultados condujeron a la suspensión del tratamiento con interferón en octubre de ese mismo año.

La evaluación de otras formulaciones de interferón, como interferón lambda, no ha mostrado beneficio clínico de su administración en pacientes ambulatorios con infección por COVID-19 no complicada (Jagannathan *et al.* 2021).

Las guías actuales recomiendan en contra de la administración de interferón en el tratamiento de la infección por COVID-19, tanto en pacientes hospitalizados como ambulatorios (COVID-19 Treatment Guidelines 2022).

10. IVERMECTINA

La ivermectina, un derivado de las avermectinas aislada de caldos de fermentación de *Streptomyces avermitilis*, se descubrió en una muestra de suelo tomada en un campo de golf de Japón en los años 70 (Grayson *et al.* 2018). Actúa activando los canales de cloruro activados por el glutamato, lo que provoca una hiperpolarización y una parálisis muscular, ocasionando la muerte de los parásitos (Grayson *et al.* 2018). También interactúa con otros canales de cloruro activados por ligandos como en el que interviene el neurotransmisor GABA (Ficha Técnica Ivergalen 2022). Es importante destacar que solo actúa a este nivel en los invertebrados, ya que en humanos no atraviesa la barrera hematoencefálica y además los canales donde actúa no se encuentran en los humanos (Ficha Técnica Ivergalen 2022). Se utiliza para el tratamiento de la oncocercosis, la filariasis linfática, la sarna sarcóptica, la estrongiloidiasis o la larva migratoria cutánea (Grayson *et al.* 2018).

La ivermectina presenta una biodisponibilidad del 60%, siendo recomendable tomarlo en ayunas. Se metaboliza en el hígado (principalmente en el CYP3A4) y es eliminada principalmente con las heces. Su semivida de eliminación es de 12 horas y la de sus metabolitos 3 días (Ficha Técnica Ivergalen 2022). No presenta interacciones clínicamente relevantes.

La dosificación del fármaco depende de la indicación para que se utiliza, variando entre los 150-200 µg/kg por vía oral en una única toma excepto en el caso de la microfilaremia causada por *Wuchereria bancrofti* (Ficha Técnica Ivergalen 2022).

Los efectos adversos más frecuentes son los trastornos de la sangre y el sistema linfático (leucopenia, linfadenopatía y elevación de las transaminasas); trastornos gastrointestinales (dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarreas); anorexia; trastornos del sistema nervioso (mareos, vértigo, temblor, somnolencia) y los trastornos de la piel (prurito, erupción, urticaria) (Ficha Técnica Ivergalen 2022).

La ivermectina presenta actividad *in vitro* contra diversos virus como el del dengue, el del Nilo Occidental o el de la pseudorabia (Caly *et al.* 2020). Sin embargo, se ha demostrado que esta actividad *in vitro* es difícil de trasladar al ámbito clínico, posiblemente porque las concentraciones antivirales requeridas son demasiado altas para alcanzarlas *in vivo*(Dinesh Kumar *et al.* 2022). En cuanto al SARS-CoV-2, un modelo *in vitro* demostró que la adición de 5 µM de ivermectina a células Vero/hSLAM infectadas con SARS-CoV-2 durante 48 h redujo el ARN viral 5000 veces (Caly *et al.* 2020). La ivermectina actúa sobre la entrada del virus, sobre la superfamilia de las importinas, sobre la replicación viral o como ionóforo (Caly *et al.* 2020). Además de su actividad *in vitro*, otras características de este fármaco centraron la atención en la ivermectina e impulsaron el estudio de este fármaco como potencial tratamiento de la enfermedad por coronavirus-19 (COVID-19): su actividad inmunomoduladora, su bajo coste, su perfil de seguridad, su posibilidad de administración oral y su distribución a nivel mundial.

Varias revisiones sistemáticas y metaanálisis evaluaron el impacto de la ivermectina en diferentes estadios de la enfermedad (profilaxis postexposición o tratamiento para pacientes ambulatorios/ingresados) (Popp *et al.* 2021; Roman *et al.* 2022). En estos trabajos se demostró que la ivermectina no aportaba ningún beneficio clínico.

Desde estos metaanálisis, nuevos ECA han ratificado la falta de beneficios clínicos de este fármaco (Monah *et al.* 2021; Vallejos *et al.* 2021; Abd-Elsalam *et al.* 2021). Los ECA más recientes realizados en pacientes de alto riesgo también han demostrado la falta de eficacia de ivermectina, al no prevenir la progresión a enfermedad grave (Reis *et al.* 2022; Lim *et al.* 2022).

Dentro de las posibles causas de su falta de eficacia cabe destacar:

El efecto *in vitro* de la ivermectina fue demostrado únicamente con concentraciones altas, las cuales requerirían una dosis >50 veces superior a la habitual para conseguir el efecto antiviral (Caly *et al.* 2020; Roman *et al.* 2022). De hecho, dosis cien veces superiores a las dosis habitualmente utilizadas no alcanzarían valores de C_{max} de 5 µM. Así mismo, la actividad *in vitro* fue demostrada en células VERO E6, pero no consiguió inhibir la infección en modelos celulares derivados de las vías respiratorias humanas, ni siquiera a concentraciones de 10 µM (Dinesh Kumar *et al.* 2022). La actividad inmunomoduladora solo ha sido demostrada *in vitro* y además ya se dispone de fármacos antiinflamatorios (corticoides, tocilizumab) que han demostrado beneficio clínico y son seguros (Bhimraj *et al.* 2022).

La ivermectina parece ser un fármaco seguro con eventos adversos poco frecuentes y en su mayoría leves a dosis estándar (dosis única de 200 µg/kg). El uso de este fármaco para la COVID-19 se ha relacionado con importantes efectos tóxicos, como el malestar gastrointestinal, confusión, ataxia, debilidad, hipotensión y convulsiones llegando a requerir ingreso hospitalario (Temple *et al.* 2021).

La evidencia disponible muestra que la ivermectina no debería utilizarse para la prevención o el tratamiento de la COVID-19, basándose en la falta de beneficios clínicos y en los importantes problemas de seguridad.

11. LOPINAVIR / RITONAVIR

Lopinavir/Ritonavir está indicado, en combinación con otros medicamentos antirretrovirales, para el tratamiento de adultos, adolescentes y niños mayores de 2 años infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Ficha Técnica Kaletra 2022).

Lopinavir es un potente inhibidor péptido-mimético de la proteasa del VIH-1. Mediante un enlace hidroxietileno, se convierte en un sustrato no hidrolizable por la proteasa del VIH-1. De esta forma, previene la escisión de la poliproteína *gag-pol*, dando lugar a la producción de un virus inmaduro no infeccioso (Cvetkovic y Goa 2003).

La biodisponibilidad oral de lopinavir es de tan solo un 25 %, pero su administración junto con ritonavir, que inhibe su metabolismo mediante inhibición del CYP3A, aumenta el área bajo la curva (AUC) unas 77 veces (Cvetkovic y Goa 2003). Lopinavir se une aproximadamente en un 98-99 % a proteínas plasmáticas y se metaboliza en el hígado, casi exclusivamente por la isoenzima CYP3A (Ficha Técnica Kaletra 2022). La semivida de eliminación es entre 5-6 horas (Ficha Técnica Kaletra 2022). Las interacciones principales con otros medicamentos derivan de la inhibición de ambos compuestos del CYP3A.

La dosis habitual recomendada es de 400/100 mg (dos comprimidos de 200/50 mg) dos veces al día (Ficha Técnica Kaletra 2022).

Los efectos adversos más comunes son diarrea, náuseas, vómitos, infecciones respiratorias y aumento de las enzimas hepáticas (Ficha Técnica Kaletra 2022).

Lopinavir demostró efecto antiviral frente a SARS-CoV-1 y SARS-CoV-2, MERS-CoV y hCoV-229E (De Wilde *et al.* 2014; Choy *et al.* 2020). El posible mecanismo de acción de lopinavir frente al SARS-CoV-2 es la inhibición de la proteasa viral Mpro (Simsek-Yavus *et al.* 2021). Las proteasas catalizan su propia liberación, así como la liberación de otras proteínas no estructurales de la poliproteína, formando el complejo replicasa-transcriptasa (RTC) que es vital para la transcripción y replicación del virus. La proteasa Mpro tiene un nivel elevado de conservación estructural en los 12 diferentes coronavirus, lo cual podría dar una oportunidad de diseñar un inhibidor pan-coronavirus de las proteasas virales (Simsek-Yavus *et al.* 2021).

En un ECA, lopinavir/ritonavir no aceleró la mejoría clínica de forma significativa, ni redujo la mortalidad, ni disminuyó la detección de RNA viral en la garganta de pacientes con COVID-19 severa (Cao *et al.* 2020). Además, solo el 14 % de los pacientes finalizaron los 14 días de tratamiento debido a efectos adversos gastrointestinales (Cao *et al.* 2020).

La revocación de su aprobación para la COVID-19 se produjo tras la publicación de dos ensayos clínicos, el RECOVERY en pacientes hospitalizados (Horby *et al.* 2020) y el REMAP-CAP en pacientes críticos (Arabi *et al.* 2021). El ensayo RECOVERY no demostró ninguna diferencia en la variable principal (mortalidad a los 28 días: 23 % en los pacientes tratados con lopinavir/ritonavir respecto a 22 % los tratados con tratamiento estándar). Tampoco observaron diferencias significativas en estancia hospitalaria ni en el riesgo de progresar a ventilación mecánica invasiva o muerte (Horby *et al.* 2020). La variable principal del REMAP-CAP fue días libres de soporte intensivo, y se observó que en el grupo de lopinavir/ritonavir fue una mediana de 4 (-1 a 15) en comparación con 6 (-1 a 16) en el grupo control que recibió el estándar de tratamiento de esa época. También se observó una mayor mortalidad intrahospitalaria en el grupo de lopinavir/ritonavir (35 % vs. 30 %) (Arabi *et al.* 2021). Estos resultados están en consonancia con el ECA llevado a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS), SOLIDARITY, donde se concluyó que el fármaco no ejercía ningún efecto en pacientes hospitalizados con la COVID-19, en cuanto a mortalidad global, inicio de la ventilación y estancia hospitalaria (Kalil *et al.* 2021).

La evidencia disponible no demuestra que lopinavir/ritonavir sea un fármaco que se pueda utilizar para el SARS-CoV-2 debido a la falta de beneficios clínicos observados en los ECA.

12. OZONO

La evidencia sobre el uso clínico del ozono es insuficiente. La ozonoterapia, que es el tratamiento basado en un gas compuesto por 3 átomos de oxígeno (O_3), solo está regulada en algunas comunidades autónomas(Hernández *et al.* 2020). En Europa, se ha usado tanto en enfermedades infecciosas, inmunológicas o cardiológicas durante una década (Zheng *et al.* 2020).

El ozono es un gas que se disuelve físicamente en agua y actúa rápidamente una vez disuelto en fluido biológico. En milisegundos, es capaz de reaccionar con enlaces dobles covalentes, preferiblemente carbono-carbono, y crear una reacción de oxidación que forme metabolitos de vida más larga. Estas especies son denominadas ozónidos (especies reactivas de oxígeno, peróxidos, hidroperóxidos y aldehídos) y actuarán como inmunomoduladores. Por tanto, la eficacia terapéutica de la ozonoterapia se debe al estrés oxidativo controlado tras reaccionar con varios componentes biológicos (Hernánez *et al.* 2020) (tales como: ácido ascórbico, urato, cisteína moléculas de glutatión y grupos tiol de albúmina) (Hernández *et al.* 2020).

Existen varias formas de administración: local, intravenosa, rectal e infiltrativa (Promoter of the Study 2020). Concretamente, la técnica de administración endovenosa del ozono se denomina auto-hemoterapia mayor (AHTM). Consiste en la extracción de sangre venosa (50-225 ml) para mezclarla con oxígeno-ozono a concentraciones de 15-70 µg/mL (Hernández *et al.* 2020). Posteriormente vuelve a ser infundida por el mismo acceso venoso (Promoter of the Study 2020).

Los efectos secundarios descritos son mínimos. La incidencia es de un 0,0007 % (Hernández *et al.* 2020).

Tras la experiencia adquirida con la ozonoterapia en pacientes con Ébola, se sugirió que en aquellas enfermedades ocasionadas por virus con susceptibilidad alta a las reacciones redox, la ozonoterapia debería ser inmediatamente estudiada como opción terapéutica (Aw *et al.* 2016). Este fundamento se basa en que los virus encapsulados con cubierta lipídica, como el coronavirus, son los más susceptibles al ozono. Su acción frente al SARS-CoV-2 podría dividirse en directa o indirecta (Hernández *et al.* 2020; Hernández *et al.* 2020):

— El coronavirus tiene en su envoltura cisteína que contiene grupos sulfhídricos. En su forma reducida, se fusionan con la célula, permitiendo su entrada. Sin embargo, estos grupos tienen una gran susceptibilidad a la oxidación y por consecuente al ozono. De este modo, si la cisteína se oxida, el virus pierde su cápside y es incapaz de replicarse. Además, la ozonoterapia activa rápidamente el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf-2). Este es capaz de bloquear la ACE2, punto de unión necesario para la fusión del virus con la célula.
— Por otro lado, el ozono tiene capacidad de activar segundos mensajeros en el citoplasma provocando una

acción inmunomoduladora del sistema inmune. También activa la liberación de interferones, moléculas antinflamatorias y vasodilatadoras, así como estimular la función fagocítica.

— Y, por último, el efecto oxigenante tisular dada la capacidad de aumentar la oxihemoglobina e incrementar la glucolisis en eritrocitos.

Por tanto, los efectos de la terapia oxígeno-ozono (O_2-O_3) son: inactivación de microorganismos, mejora de la microcirculación, poder antiinflamatorio e inmunoregulador y oxigenación de tejidos (Promoter of the Study 2020).

Los estudios muestran que la concentración media administrada de ozono en pacientes con SARS-CoV-2 fue 20-50 µg/mL (Hernández *et al.* 2020; Zheng *et al.* 2020; Hernández *et al.* 2020; Fernández-Cuadros *et al.* 2021).

El ECA SEOT (fase I) (Shah *et al.* 2021) comparó pacientes institucionalizados tratados con ozonoterapia y terapia estándar con aquellos tratados solo con el tratamiento estándar. Los resultados fueron reducción de la proteína C reactiva y sintomatología, similares a los vistos posteriormente. Se concluyó que la combinación de tratamiento estándar junto con ozonoterapia podría acelerar la recuperación clínica.

Zheng Z *et al.* (2020) reportaron dos casos clínicos en los que se realizó AHTM diaria durante 7 días consecutivos. Se mezcló 100 ml de sangre venosa a una ratio 1:1 con una concentración de O_2-O_3 igual a 20 µg/mL. Un primer paciente inició ATHM tras fracaso a terapia antiviral, antibióticos, inmunoglobulina, omeprazol y oxígeno. En el día 18 posterior al inicio, fue dado de alta con prueba negativa. Otro paciente, con patología de EPOC y tras 26 días de mala evolución y no respuesta a tratamientos antirretrovirales, antibióticos, inmunoglobulinas y oxígeno, se inició ATHM. Fue dado de alta al octavo día desde el inicio. Ninguno presentó ningún efecto adverso.

Un estudio presentó 3 pacientes ingresados con COVID-19 sin ventilación mecánica donde se mezcló 200 ml de sangre con una concentración de oxígeno-ozono igual a 40 µg/mL y se volvió a infundir 2 veces al día durante un total de 2-3 días.(Hernández *et al.* 2020). Todos, al tercer o cuarto día tras el inicio de la terapia O_2-O_3, fueron dados de alta hospitalaria.

La administración por vía rectal no resultó en una diferencia significativa de mortalidad y estancia, sin embargo, sí que se vio reducción en la necesidad de O_2 y marcadores inflamatorios (Fernández Cuadros *et al.* 2021). También hubo estudios sobre la administración vía inhalatoria, usada como una técnica de «desinfección» para incrementar la tasa de respuesta de los otros tratamientos (Dengiz *et al.* 2022).

Las ventajas de esta terapia quedarían limitadas a la mejora de los parámetros analíticos y de la necesidad de oxigenoterapia (Setyo *et al.* 2022). Actualmente, no se recomienda su utilización para el COVID-19.

13. VITAMINA D

Los seres humanos obtienen la vitamina D de forma natural a través de la exposición a la luz solar y de la dieta o a través de la administración de suplementos dietéticos. Ya sea que se obtenga de fuentes dietéticas, suplementos o de la foto-conversión cutánea, la vitamina D debe someterse a una hidroxilación secuencial para convertirse en su forma biológicamente activa, el calcitriol. El calcitriol se une al receptor nuclear de la vitamina D, y así ejerce sus acciones fisiológicas regulando directa o indirectamente la expresión génica (White *et al.* 2022).

En la última década, varios estudios han reportado la deficiencia de vitamina D como un potencial factor de riesgo de varias enfermedades, incluidas las infecciones sistémicas y enfermedades autoinmunes. Además de su conocido papel en la regulación de la homeostasis ósea, se ha demostrado que la vitamina D ejerce varias acciones extraesqueléticas, particularmente como un importante mediador de la respuesta inmunitaria innata (Bishop *et al.* 2021). Estudios *in vitro* han demostrado que la vitamina D disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias y aumenta la producción de proteínas antivirales. Cabe destacar que el calcitriol induce la transcripción de péptidos antimicrobianos –como la catelicidina y la defensina b2– en varias líneas celulares humanas, promueve la diferenciación de los monocitos/macrófagos y aumenta su capacidad quimiotáctica y fagocítica. Además, las células inmunitarias también son productoras locales de vitamina D; de hecho, varias células inmunitarias (macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B) expresan las enzimas activadoras de la vitamina D (25- y 1-alfa-hidroxilasa).

Datos recientes han demostrado que la vitamina D puede reducir el riesgo de infecciones del tracto respiratorio y, en particular, el riesgo de infecciones víricas (Jolliffe *et al.* 2021), aunque el interés por el potencial de los suplementos de vitamina D para reducir el riesgo de infecciones respiratorias agudas ha aumentado desde la aparición de la pandemia de COVID-19.

Existe un déficit de vitamina D en pacientes con infección por SARS-CoV-2 (Pinzon *et al.* 2020). El SARS-CoV-2 entra en las células respiratorias a través del receptor de la ACE2 y la hipótesis de la importancia de tratar la hipovitaminosis D en los pacientes con COVID-19 se ha originado a partir de las observaciones de que la vitamina D aumenta la concentración de la enzima convertidora de angiotensina y reduce la expresión

de la enzima convertidora de angiotensina 2 (Rhodes *et al.* 2021). Desde el punto de vista clínico, la hipovitaminosis D está relacionada con un mal pronóstico en los pacientes con COVID-19 (Munshi *et al.* 2021) y algunos estudios observacionales han demostrado un mayor riesgo de mortalidad por COVID-19 en los pacientes con deficiencia de vitamina D (Carpagnano *et al.* 2021). Sin embargo, la asociación observada entre un estado bajo de vitamina D y una mayor gravedad de la enfermedad COVID-19 podría verse afectada por los efectos de disminución de la vitamina D de la terapia crónica con corticosteroides o los períodos de inflamación sistémica pronunciada (Smolders *et al.* 2021).

Algunos estudios han revelado el déficit de vitamina D en categorías de pacientes de alto riesgo de infección por SARS-CoV-2, incluyendo la población geriátrica, así como en enfermedades crónicas como la enfermedad renal crónica o la obesidad, pudiendo estar asociado con peores resultados clínicos, una mayor gravedad y mortalidad en este grupo de pacientes (Grant *et al.* 2020). Sin embargo, estas observaciones podrían atribuirse a la presencia de factores de confusión, ya que los factores de riesgo de un estado bajo de vitamina D se solapan con los principales factores de susceptibilidad para la COVID-19 (edad avanzada, obesidad...) (Williamson *et al.* 2020).

Para reducir el riesgo de infección, algunas recomendaciones han consistido en la administración de 10.000 UI/día de vitamina D3 durante unas semanas para aumentar rápidamente las concentraciones, seguido de 5.000 UI/día, con el objetivo de elevar las concentraciones de vitamina D3 por encima de 40-60 ng/mL (100-150 nmol/L) (Grant *et al.* 2020); otros estudios recomiendan la suplementación oral con 10.000 UI/día de vitamina D durante un mes (Khovasanchi *et al.* 2022). Sin embargo, falta información sobre la dosis y la duración óptimas de la administración de suplementos de vitamina D, especialmente en pacientes hospitalizados (Pal *et al.* 2022).

Aunque algunos estudios han demostrado la eficacia de los suplementos de vitamina D en los resultados clínicos en pacientes con infección por SARS-CoV-2, los resultados de los ECA son inconsistentes y heterogéneos. Algunos estudios observacionales y ECA muestran que la suplementación con vitamina D no se asocia a una mejora de los resultados clínicos en COVID-19 (Hernández *et al.* 2021; Jevalikar *et al.* 2021; Murai *et al.* 2021). Finalmente, un estudio encontró una tendencia a una mortalidad dos veces mayor en los pacientes que reciben suplementos de vitamina D de forma rutinaria en comparación con los pacientes que no los reciben (Jawad *et al.* 2020).

Teniendo en cuenta la heterogeneidad de la evidencia clínica disponible, y aunque la deficiencia de vitamina D está claramente asociada a una peor evolución clínica en los pacientes con infección por SARS-CoV-2, no hay datos concluyentes de que la administración de suplementos de vitamina D mejore los resultados clínicos, ni tampoco existe un consenso establecido sobre la dosis y la duración óptima del tratamiento. Las guías no se posicionan respecto a la utilización de esta terapia (Bhimraj *et al.* 2022; Bartoletti *et al.* 2022, COVID-19 Treatment Guidelines 2022).

14. LIMITACIONES

Las limitaciones y causas de falta de eficacia son relativamente comunes a todos los fármacos. Hasta la presencia de ECA, los estudios realizados presentaban un bajo número de pacientes introducidos, baja calidad metodológica (estudios observacionales retrospectivos, ECA abiertos) y estos pacientes presentaban una gran heterogeneidad clínica (pacientes críticos, ambulatorios, con diferentes comorbilidades), lo cual suponía un sesgo importante. Muchos de ellos habían sido llevados a cabo durante etapas más tardías de la pandemia, donde la variabilidad de las cepas y la vacunación ha modificado la gravedad de la enfermedad. Además, los resultados en las variables evaluadas (mortalidad, ingresos hospitalarios, síntomas) difieren entre los estudios, aportando poca claridad sobre la efectividad del tratamiento. Por último, la existencia de múltiples tratamientos (corticosteroides, remdesivir, nirmatrelvir/ritonavir, tocilizumab, etc.) con evidencia demostrada puede ser un factor de confusión a la hora de analizar los resultados.

Otras limitaciones comunes incluyen los diferentes estadios de la enfermedad donde han sido estudiados, las diferentes posologías y administraciones.

La pandemia de COVID-19 ha puesto de manifiesto la importancia de la medicina basada en la evidencia. El uso de numerosos fármacos (hidroxicloroquina, azitromicina, lopinavir/ritonavir) se recomendó inicialmente sobre la base de los beneficios encontrados en estudios *in vitro*, informes de casos y estudios observacionales (Glesvy y Gulick 2021). Esto fue incluso alimentado por la prensa popular y de medios sociales, con la desesperación de «hacer algo» (Glesby y Gulick 2021). Sin embargo, la utilización indiscriminada y sin evidencia ha ocasionado numerosos efectos adversos, así como problemas de suministro (hidroxicloroquina, ivermectina) en patologías donde cuentan con un buen aval de evidencia (Mendel *et al.* 2021).

CONCLUSIONES

A pesar de los intentos por encontrar terapias adecuadas para el tratamiento de la COVID-19, en el presente capítulo se resumen algunos de los fármacos que, a pesar de

obtener resultados positivos *in vitro* o en estudios observacionales, no han demostrado ningún beneficio clínico en los ECA.

Estos resultados ponen de manifiesto la dificultad de obtener tratamientos adecuados en las infecciones virales y la importancia de la medicina basada en la evidencia. Lo observado en esta pandemia debería servir a la comunidad científica para aprender y prepararse de cara a las más que probables futuras pandemias.

BIBLIOGRAFÍA

ABANI, O., ABBAS, A., ABBAS, F., ABBAS, M., ABBASI, S., ABBASS, H. *et al.* (2022), Casirivimab and Imdevimab in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. Lancet. 399(10325): 665-676.

ABD-ELSALAM, S., NOOR, R.A., BADAWI, R., KHALAF, M., ESMAIL, E.S., SOLIMAN, S. *et al.* (2021), Clinical Study Evaluating the Efficacy of Ivermectin in COVID-19 Treatment: A Randomized Controlled Study. Journal of Medical Virology 93(10): 5833-5838.

ADMINISTRATION, D. (2019) Fact Sheet for Health Care Providers Bamlanivimab/Etesivimab. 1-36. Available from: https://www.fda.gov/media/143603/download

AGUSTÍ, A., DE STEFANO, G., LEVI, A., MUÑOZ, X., ROMERO-MESONES, C., SIBILA, O. *et al.* (2022), Add-on Inhaled Budesonide in the Treatment of Hospitalised Patients with COVID-19: A Randomised Clinical Trial. European Respiratory Journal 59: 2103036.

AL SULAIMAN, K., ALJUHANI, O., AL AAMER, K., AL SHAYA, O., AL SHAYA, A., ALSAEEDI, A.S. *et al.* (2022), The Role of Inhaled Corticosteroids (ICS) in Critically Ill Patients with COVID-19: A Multicenter, Cohort Study. Journal of Intensive Care Medicine 37(2): 248-257.

ALAVI DARAZAM, I., HATAMI, F., MAHDI RABIEI, M., AMIN POURHOSEINGHOLI, M., SHABANI, M., SHOKOUHI, S. *et al.* (2021), An Investigation into the Beneficial Effects of High-Dose Interferon Beta 1-a, Compared to Low-Dose Interferon Beta 1-a in Severe COVID-19: The COVIFERON II Randomized Controlled Trial. International Immunopharmacology 99: 107916.

ALEEM, A., SAMAD, A.B.A. & SLENKER, A.K. (2022), Emerging Variants of SARS-CoV-2 and Novel Therapeutics against Coronavirus (COVID-19). StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

ARABI, Y.M., GORDON, A.C., DERDE, L.P.G., NICHOL, A.D., MURTHY, S., BEIDH, F. Al. *et al.* (2021), Lopinavir-ritonavir and Hydroxychloroquine for Critically Ill Patients with COVID-19: REMAP-CAP Randomized Controlled Trial. Intensive Care Medicine 47(8): 867-886.

ARSHAD, S., KILGORE, P., CHAUDHRY, Z.S., JACOBSEN, G., WANG, D.D., HUITSING, K. *et al.* (2020), Treatment with Hydroxychloroquine, Azithromycin, and Combination in Patients Hospitalized with COVID-19. International Journal of Infectious Diseases 97: 396-403.

BAKER, J.R., MAHDI, M., NICOLAU, D. V., RAMAKRISHNAN, S., BARNES, P.J., SIMPSON, J.L. *et al.* (2022), Early Th2 Inflammation in the Upper Respiratory Mucosa as a Predictor of Severe COVID-19 and Modulation by Early Treatment with Inhaled Corticosteroids: A Mechanistic Analysis. The Lancet Respiratory Medicine 10(6): 545-556.

BARIOLA, J.R., MCCREARY, E.K., WADAS, R.J., KIP, K.E., MARROQUIN, O.C., MINNIER, T. *et al.* (2021), Impact of Bamlanivimab Monoclonal Antibody Treatment on Hospitalization and Mortality among Non-Hospitalized Adults with SARS-CoV-2 Infection. Open Forum Infectious Diseases 8(7): ofab254 (8 pp).

BARTOLETTI, M., AZAP, O., BARAC, A., BUSSINI, L., ERGONUL, O., KRAUSE, R. *et al.* (2022), ESCMID COVID-19 Guidelines: Update on Treatment for Patients with Mild/Moderate Disease. Clin Microbiology and Infection 28(12): P1578-1590.

BAUM, A., FULTON, B.O., WLOGA, E., COPIN, R., PASCAL, K.E., RUSSO, V. *et al.* (2020), Antibody Cocktail to SARS-CoV-2 Spike Protein Prevents Rapid Mutational Escape Seen with Individual Antibodies. Science 369(6506): 1014-1018.

BAVARO, D.F., DIELLA, L., SOLIMANDO, A.G., CICCO, S., BUONAMICO, E., STASI, C. *et al.* (2022), Bamlanivimab and Etesevimab Administered in an Outpatient Setting for SARS-CoV-2 Infection. Pathogens and Global Health 116(5): 297-304.

BEN-ZVI, I., KIVITY, S., LANGEVITZ, P. & SHOENFELD, Y. (2012), Hydroxychloroquine: From Malaria to Autoimmunity. Clinical Reviews in Allergy & Immunology 42(2): 145-153.

BHIMRAJ, A., MORGAN, R.L., SHUMAKER, A.H., BADEN, L., CHENG, V.C., EDWARDS, K.M. *et al.* (2022), Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients with COVID-19. Clinical Infectious Diseases 27: ciaaa478.

BISHOP, E., ISMAILOVA, A., DIMELOE, S., HEWISON, M. & WHITE, J.H. (2021), Vitamin D and Immune Regulation: Antibacterial, Antiviral, Anti-Inflammatory. JBMR Plus. 5(1): 1-23.

BORBA, M.G.S., VAL, F.F.A., SAMPAIO, V.S., ALEXANDRE, M.A.A., MELO, G.C., BRITO, M. *et al.* (2020),

Effect of High vs. Low Doses of Chloroquine Diphosphate as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection: A Randomized Clinical Trial. JAMA Network Open 3(4): e208857.

BRAMANTE, C.T., HULING, J.D., TIGNANELLI, C.J., BUSE, J.B., LIEBOVITZ, D.M., NICKLAS, J.M. *et al.* (2022), Randomized Trial of Metformin, Ivermectin, and Fluvoxamine for COVID-19. New England Journal of Medicine 387(7): 599-610.

BUTLER, C.C., DORWARD, J., YU, L.M., GBINIGIE, O., HAYWARD, G., SAVILLE, B.R. *et al.* (2021), Azithromycin for Community Treatment of Suspected COVID-19 in People at Increased Risk of an Adverse Clinical Course in the UK (PRINCIPLE): A Randomised, Controlled, Open-Label, Adaptive Platform Trial. The Lancet 397(10279): 1063-1074.

CAI, Q., YANG, M., LIU, D., CHEN, J., SHU, D., XIA, J. *et al.* (2020), Experimental Treatment with Favipiravir for COVID-19: An Open-Label Control Study. Engineering (Beijing) 6(10): 1192-1198.

CALY, L., DRUCE, J.D., CATTON, M.G., JANS, D.A. & WAGSTAFF, K.M. (2020), The FDA-Approved Drug Ivermectin Inhibits the Replication of SARS-CoV-2 In Vitro. Antiviral Research 178: 104787.

CAO, B., WANG, Y., WEN, D., LIU, W., WANG, J., FAN, G. *et al.* (2020), A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe COVID-19. New England Journal of Medicine 382(19): 1787-1799.

CARPAGNANO, G.E., DI LECCE, V., QUARANTA, V.N., ZITO, A., BUONAMICO, E., CAPOZZA, E. *et al.* (2021), Vitamin D Deficiency as a Predictor of Poor Prognosis in Patients with Acute Respiratory Failure Due to COVID-19. Journal of Endocrinological Investigation 44(4): 765-771.

CAVALCANTI, A.B., ZAMPIERI, F.G., ROSA, R.G., AZEVEDO, L.C.P., VEIGA, V.C., AVEZUM, A. *et al.* (2020), Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate COVID-19. New England Journal of Medicine 383(21): 2041-2052.

CDC (2022), SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions.

CHANG, D., SALEH, M., GABRIELS, J., ISMAIL, H., GOLDNER, B., WILLNER, J. *et al.* (2020), Inpatient use of Ambulatory Telemetry Monitors for COVID-19 Patients Treated with Hydroxychloroquine and/or Azithromycin. Journal of the American College of Cardiology 75(23): 2992-2993.

CHAUHAN, L., PATTEE, J., FORD, J., THOMAS, C., LESTEBERG, K., RICHARDS, E. *et al.* (2022), A Multicenter, Prospective, Observational, Cohort-Controlled Study of Clinical Outcomes Following Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Convalescent Plasma Therapy in Hospitalized Patients with COVID-19. Clinical Infectious Diseases 75(1): e466-72.

CHEN, C., ZHANG, Y., HUANG, J., YIN, P., CHENG, Z., WU, J. *et al.* (2021), Favipiravir versus Arbidol for Clinical Recovery Rate in Moderate and Severe Adult COVID-19 Patients: A Prospective, Multicenter, Open-Label, Randomized Controlled Clinical Trial. Frontiers in Pharmacology 12: 683296.

CHOY, K.T., WONG, A.Y.L., KAEWPREEDEE, P., SIA, S.F., CHEN, D., HUI, K.P.Y. *et al.* (2020), Remdesivir, Lopinavir, Emetine, and Homoharringtonine Inhibit SARS-CoV-2 Replication In Vitro. Antiviral Research 178(March): 104786.

COOPER, M.H., CHRISTENSEN, P.A., SALAZAR, E., PEREZ, K.K., GRAVISS, E.A., NGUYEN, D. *et al.* (2021), Real-World Assessment of 2,879 COVID-19 Patients Treated with Monoclonal Antibody Therapy: A Propensity Score-Matched Cohort Study. Open Forum Infectious Diseases 8(11):ofab512.

COVID-19 Treatment Guidelines [Internet]. 2022 [cited 2022 Sep 22]. Available from: https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov

CVETKOVIC, R.S. & GOA, K.L. (2003), Lopinavir/Ritonavir: A Review of Its Use in the Management of HIV-1 Infection. Drugs 63(8): 769-802.

DALEY-YATES, P.T. (2015), Inhaled Corticosteroids: Potency, Dose Equivalence And Therapeutic Index. Brithis Journal of Clinical Pharmacology 80(3): 372-380.

DAMLE, B., VOURVAHIS, M., WANG, E., LEANEY, J. & CORRIGAN, B. (2020), Clinical Pharmacology Perspectives on the Antiviral Activity of Azithromycin and Use in COVID-19. Clinical Pharmacology and Therapeutics 108(2): 201-211.

DANESI, R., LUPETTI, A., BARBARA, C., GHELARDI, E., CHELLA, A., MALIZIA, T. *et al.* (2003), Comparative Distribution of Azithromycin in Lung Tissue of Patients Given Oral Daily Doses of 500 and 1000 mg. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51(4): 939-945.

DE WILDE, A.H., JOCHMANS, D., POSTHUMA, C.C., ZEVENHOVEN-DOBBE, J.C., VAN NIEUWKOOP, S., BESTEBROER, T.M. *et al.* (2014), Screening of an FDA-Approved Compound Library Identifies Four Small-Molecule Inhibitors of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Replication in Cell Culture. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58(8): 4875-4884.

DENGIZ, E., ÖZCAN, Ç., GÜVEN, Y., UÇAR, S., ENER, B., SÖZEN, S. *et al.* (2022), Ozone Gas Applied through Nebulization as Adjuvant Treatment for Lung Respiratory Diseases Due to COVID-19 Infections: A Prospective Randomized Trial. Medical Gas Research 12(2): 55-59.

DINESH KUMAR, N., TER ELLEN, B.M., BOUMA, E.M., TROOST, B., VAN DE POL, D.P.I., VAN DER

ENDE-METSELAAR, H.H. *et al.* (2022), Moxidectin and Ivermectin Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Vero E6 Cells but Not in Human Primary Airway Epithelium Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 66(1): e0154321.

DOGGRELL, S.A. (2021), Do We Need Bamlanivimab? Is Etesevimab a Key to Treating COVID-19? Expert Opinion on Biological Therapy 21(11): 1359-1362.

DORWARD, J., YU, L.M., HAYWARD, G., SAVILLE, B.R., GBINIGIE, O., VAN HECKE, O. *et al.* (2022), Colchicine for COVID-19 in the Community (PRINCIPLE): A Randomised, Controlled, Adaptive Platform Trial. Brithis Journal of General Practice 72(720): e446-55.

DOS REIS NETO, E.T., KAKEHASI, A.M., DE MEDEIROS PINHEIRO, M., FERREIRA, G.A., LOPES MARQUES, C.D., DA MOTA, L.M.H. *et al.* (2020), Revisiting Hydroxychloroquine and Chloroquine for Patients with Chronic Immunity-Mediated Inflammatory Rheumatic Diseases. Advances in Rheumatology 60(1): 32.

EDINOFF, A.N., AKULY, H.A., HANNA, T.A., OCHOA, C.O., PATTI, S.J., GHAFFAR, Y.A. *et al.* (2021), Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Adverse Effects: A Narrative Review. Neurol International 13(3): 387-401.

EMA (2021), European Medicines Agency. European Medicines Agency recommendations on Casirivimab and imdevimab, 7(March): 6.

ESTCOURT, L.J., COHN, C.S., PAGANO, M.B., IANNIZZI, C., KREUZBERGER, N., SKOETZ, N. *et al.* (2022), Clinical Practice Guidelines From the Association for the Advancement of Blood and Biotherapies (AABB): COVID-19 Convalescent Plasma. Annales of Internal Medicine 175(9): 1310-1321.

EZER, N., BELGA, S., DANEMAN, N., CHAN, A., SMITH, B.M., DANIELS, S.A. *et al.* (2021), Inhaled and Intranasal Ciclesonide for the Treatment of COVID-19 in Adult Outpatients: CONTAIN Phase II Randomised Controlled Trial. BMJ 375: 1-8.

FALCONE, M., TISEO, G., VALORIANI, B., BARBIERI, C., OCCHINERI, S., MAZZETTI, P. *et al.* (2021), Efficacy of Bamlanivimab/Etesevimab and Casirivimab/Imdevimab in Preventing Progression to Severe COVID-19 and Role of Variants of Concern. Infectious Diseases and Therapy 10(4): 2479-2488.

FANTINI, J., CHAHINIAN, H. & YAHI, N. (2020), Synergistic Antiviral Effect of Hydroxychloroquine and Azithromycin in Combination against SARS-CoV-2: What Molecular Dynamics Studies of Virus-Host Interactions Reveal. International Journal of Antimicrobial Agents 55(5): 106020.

FELICITY, L. & OPENSHAW, P.J.M. (2021), Inhaled Corticosteroids: Not Just for Asthma, but for COVID-19? Published Coronavirus COVID – Research that Is Available on the COVID-19 Resource Centre – Including this Comment Beyond Vaccine Hesitancy : The Lancet. 2: 2020-2022.

FERNÁNDEZ-CUADROS, M.E., ALBALADEJO-FLORÍN, M.J., ÁLAVA-RABASA, S., GALLEGO-GALIANA, J., PÉREZ-CRUZ, G.F., USANDIZAGA-ELIO, I. *et al.* (2021), Compassionate Use of Rectal Ozone (O_3) in Severe COVID-19 Pneumonia: A Case-Control Study. SN Comprehensive Clinical Medidine 3(5): 1185-1199.

FICHA TÉCNICA COLCHICINA SEID 0,5 MG COMPRIMIDOS [Internet] [cited 2022 Sep 22]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/78947/FT_78947.html

FICHA TÉCNICA EXTAVIA 250 MICROGRAMOS/ML POLVO Y DISOLVENTE PARA SOLUCION INYECTABLE [Internet] [cited 2022 Sep 22]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/108454008/FT_108454008.html

FICHA TÉCNICA FLUVOXAMINA SANDOZ 100 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA EFG [Internet] [cited 2022 Sep 27]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/63277/FT_63277.html

FICHA TÉCNICA IVERGALEN 3 MG COMPRIMIDOS EFG [Internet] [cited 2022 Sep 22]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/85728/FT_85728.html

FICHA TÉCNICA KALETRA 200 mg/50 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA [Internet] [cited 2022 Sep 27]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/01172008/FT_01172008.html

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION f. Ficha técnica para proveedores de atención médica autorización de uso de emergencia (EUA) de regen-cov tm (casirivimab e imdevimab) uso autorizado [cited 2022 Sep 22]; Available from: https://www.cdc.gov/growthcharts/clinical_charts.htm

FURUTA, Y., KOMENO, T. & NAKAMURA, T. (2017), Favipiravir (T-705), a Broad Spectrum Inhibitor of Viral RNA Polymerase. Proceedings of the Japan Academy Series B Physical and Biological Sciences 93(7): 449-463.

GALVAN, C.A., TORIBIO-DIONICIO, C.G., ÁLVAREZ-ÁNGELES, M.A., ALAMA-BAZÁN, O.D. & SÁNCHEZ-REMÍREZ, L.A. (2020), Convalescent Plasma Transfusion of COVID-19 Patients: Proposal from the Peruvian Immunology Society and the Peruvian Medical Association of Clinical Pathology for Its Implementation in our country. SciELO Prepr. 1-21.

GHARBHARAN, A., JORDANS, C., ZWAGINGA, L., PAPAGEORGIOU, G., VAN GELOVEN, N., VAN WIJNGAARDEN, P. *et al.* (2022), Outpatient Convalescent

Plasma Therapy for High-Risk Patients with Early COVID-19. A Randomized Placebo-Controlled Trial. Clinical Microbiology and Infection 29(2): 208-214.

GIOVANETTI, M., BENEDETTI, F., CAMPISI, G., CICCOZZI, A., FABRIS, S., CECCARELLI, G. *et al.* (2021), Evolution Patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on Its Genome Variants. Biochemical and Biophysal Research Communications 538: 88-91.

GLESBY, M.J. & GULICK, R.M. (2021), Selecting Treatments during an Infectious Disease Pandemic: Chasing the Evidence. Annales of Internal Medicine 174(10): 1464-1465.

GORDON, O., BROSNAN, M.K., YOON, S., JUNG, D., LITTLEFIELD, K., GANESAN, A. *et al.* (2022), Pharmacokinetics of High-Titer Anti-SARS-CoV-2 Human Convalescent Plasma in High-Risk Children. JCI Insight 7(2): e151518.

GORELIK, E., MASARWA, R., PERLMAN, A., ROTSHILD, V., MUSZKAT, M. & MATOK, I. (2018), Systematic Review, Meta-Analysis, and Network Meta-Analysis of the Cardiovascular Safety of Macrolides. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 62(6): e00438-18.

GOTTLIEB, R.L., NIRULA, A., CHEN, P., BOSCIA, J., HELLER, B., MORRIS, J. *et al.* (2021), Effect of Bamlanivimab as Monotherapy or in Combination with Etesevimab on Viral Load in Patients with Mild to Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. JAMA 325(7): 632-644.

GRANT, W.B., LAHORE, H., McDONNELL, S.L., BAGGERLY, C.A., FRENCH, C.B., ALIANO, J.L. *et al.* (2020), Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths. Nutrients 12(4): 1-19.

GRAYSON, M.L., COSGROVE, S.E., CROWE, S., HOPE, W.W., McCARTHY, J., MILLS, J. *et al.* (2018), *Kucers' the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs*, Seventh Edition – Three Volume Set. Florida: CRC Press Taylor & Francis; pp. 185-193.

GUO, C.M., HARARI, O., CHERNECKI, C., THORLUND, K. & FORREST, J.I. (2022), Fluvoxamine for the Early Treatment of COVID-19: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 106(5): 1315-1320.

GYSELINCK, I., LIESENBORGHS, L., BELMANS, A., ENGELEN, M.M., BETRAINS, A., VAN THILLO, Q. *et al.* (2022), Azithromycin for Treatment of Hospitalised COVID-19 Patients: A Randomised, Multicentre, Open-Label Clinical Trial (DAWn-AZITHRO). ERJ Open Research 8(1): 00610-2021.

HAYDEN, F.G. & SHINDO, N. (2019), Influenza Virus Polymerase Inhibitors in Clinical Development. Current Opinion in Infectious Diseases 32(2): 176-186.

HERNÁNDEZ, J.L., NAN, D., FERNANDEZ-AYALA, M., GARCIÁ-UNZUETA, M., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, M.A., LÓPEZ-HOYOS, M. *et al.* (2021), Vitamin D Status in Hospitalized Patients with SARS-CoV-2 Infection. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 106(3): e1343-53.

HERNÁNDEZ, A., PAPADAKOS, P.J., TORRES, A., GONZÁLEZ, D.A., VIVES, M., FERRANDO, C. *et al.* (2020a), Two Known Therapies Could Be Useful as Adjuvant Therapy in Critical Patients Infected by COVID-19. Revista Española de Anestesiología y Reanimación 67(5): 245-252.

HERNÁNDEZ, A., VIÑALS, M., ISIDORO, T. & VILÁS, F. (2020b), Potential Role of Oxygen-Ozone Therapy in Treatment of COVID-19 Pneumonia. American Journal of Case Reports 21: 1-6.

HORBY, P.W., MAFHAM, M., BELL, J.L., LINSELL, L., STAPLIN, N., EMBERSON, J. *et al.* (2020), Lopinavir-Ritonavir in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. The Lancet. 396(10259): 1345-1352.

HUNG, I.F.N., LUNG, K.C., TSO, E.Y.K., LIU, R., CHUNG, T.W.H., CHU, M.Y. *et al.* (2020), Triple Combination of Interferon Beta-1b, Lopinavir–Ritonavir, and Ribavirin in the Treatment of Patients Admitted to Hospital with COVID-19: An Open-Label, Randomised, Phase 2 Trial. The Lancet 395(10238): 1695-1704.

IANNETTA, M., IPPOLITO, G. & NICASTRI, E. (2017), Azithromycin Shows Anti-Zika Virus Activity in Human Glial Cells. Antimicrob Agents and Chemotherapy 61(9): e01152-17.

IDSA (2022) Guideline on the Treatment and Management of COVID-19: Colchicine. Infectious Diseases Society of America.

IVASHCHENKO, A.A., DMITRIEV, K.A., VOSTOKOVA, N. V., AZAROVA, V.N., BLINOW, A.A., EGOROVA, A.N. *et al.* (2021), AVIFAVIR for Treatment of Patients with Moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Interim Results of a Phase II/III Multicenter Randomized Clinical Trial. Clinical Infectious Diseases 73(3): 531-534.

JAGANNATHAN, P., ANDREWS, J.R., BONILLA, H., HEDLIN, H., JACOBSON, K.B., BALASUBRAMANIAN, V. *et al.* (2021), Peginterferon Lambda-1a for Treatment of Outpatients with Uncomplicated COVID-19: A Randomized Placebo-Controlled Trial. Nature Communications 12(1): 1967.

JAWAD, S., SHAHZAD, H., NAIFAR, N., TOHME, P., ..., ABI-HABIB, R., CASTELPIETRA, G., COLLI, C. *et al.* (2020), Since January 2020 Elsevier Has Created a COVID-19 Resource Centre with Free Information in English and Mandarin on the Novel Coronavirus

COVID-19. The COVID-19 Resource Centre Is Hosted on Elsevier Connect, the Company's Public News and Information. Psychiatry Research 14(4) (January): 293.

JEVALIKAR, G., MITHAL, A., SINGH, A., SHARMA, R., FAROOQUI, K.J., MAHENDRU, S. *et al.* (2021), Lack of Association of Baseline 25-Hydroxyvitamin D Levels with Disease Severity and Mortality in Indian Patients Hospitalized for COVID-19. Scientific Reports 11(1): 1-8.

JOLLIFFE, D.A., CAMARGO, C.A., SLUYTER, J.D., AGLIPAY, M., ALOIA, J.F., GANMAA, D. *et al.* (2021), Vitamin D Supplementation to Prevent Acute Respiratory Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data from Randomised Controlled Trials. The Lancet Diabetes Endocrinology 9(5): 276-292.

JOSHI, S., PARKAR, J., ANSARI, A., VORA, A., TALWAR, D., TIWASKAR, M. *et al.* (2021), Role of Favipiravir in the Treatment of COVID-19. International Journal of Infectious Diseases 102: 501-508.

KALIL, A.C., MEHTA, A.K., PATTERSON, T.F., ERDMANN, N., GOMEZ, C.A., JAIN, M.K. *et al.* (2021), Efficacy of Interferon Beta-1a Plus Remdesivir Compared with Remdesivir Alone in Hospitalised Adults with COVID-19: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. The Lancet Respiratory Medicine 9(12): 1365-1376.

KANOH, S. & RUBIN, B.K. (2010), Mechanisms of Action and Clinical Application of Macrolides as Immunomodulatory Medications. Clinical Microbiology Reviews 23(3): 590-615.

KHORASANCHI, Z., JAFAZADEH ESFEHANI, A., SHARIFAN, P., HASANZADEH, E., MOGHADAM, M.R.S.F., AHMADI, O. *et al.* (2022), The Effects of High Dose Vitamin D Supplementation as a Nutritional Intervention Strategy on Biochemical and Inflammatory Factors in Adults with COVID-19: Study Protocol for a Randomized Controlled Trial. Nutrition and Health 28(3): 311-317.

KLEIN, E.Y., MONTEFORTE, B., GUPTA, A., JIANG, W., MAY, L., HSIEH, Y.H. *et al.* (2016), The Frequency of Influenza and Bacterial Coinfection: A Systematic Review and Meta-Analysis. Influenza and Other Respiratory Viruses 10(5): 394-403.

LANGFORD, B.J., SO, M., RAYBARDHAN, S., LEUNG, V., SOUCY, J.P.R., WESTWOOD, D. *et al.* (2021), Antibiotic Prescribing in Patients with COVID-19: Rapid Review and Meta-Analysis. Clinical Microbiology and Infection 27(4): 520-531.

LANGFORD, B.J., SO, M., RAYBARDHAN, S., LEUNG, V., WESTWOOD, D., MACFADDEN, D.R. *et al.* (2020), Bacterial Co-Infection and Secondary Infection in Patients with COVID-19: A Living Rapid Review and Meta-Analysis. Clinical Microbiology and Infection 26(12): 1622-1629.

LI. C., ZU, S., DENG, Y.Q., LI, D., PARVATIYAR, K., QUANQUIN, N. *et al.* (2019), Azithromycin Protects against Zika Virus Infection by Upregulating Virus-Induced Type I and III Interferon Responses. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 63(12): e00394-19.

LIM, S.C.L., HOR, C.P., TAY, K.H., JELANI, A.M., TAN, W.H., KER, H.B. *et al.* (2022), Efficacy of Ivermectin Treatment on Disease Progression among Adults with Mild to Moderate COVID-19 and Comorbidities: The I-TECH Randomized Clinical Trial. JAMA Internal Medicine 182(4): 426-435.

LIU, J., CAO, R., XU, M., WANG, X., ZHANG, H., HU, H. *et al.* (2020), Hydroxychloroquine, a Less Toxic Derivative of Chloroquine, Is Effective in Inhibiting SARS-CoV-2 Infection In Vitro. Cell Discovery 6(1): 6-9.

MAIER, H.J., BICKERTON, E. & BRITTON, P. (2015), Coronaviruses. Methods and Protocols, Springer: New York; pp 1-23.

MAHÉVAS, M., TRAN, V.T., ROUMIER, M., CHABROL, A., PAULE, R., GUILLAUD, C. *et al.* (2020), Clinical Efficacy of Hydroxychloroquine in Patients with COVID-19 Pneumonia Who Require Oxygen: Observational Comparative Study Using Routine Care Data. BMJ [Internet] [cited 2020 May 23]; 369:m1844. Available from: http://dx.doi.org/10.1136/bmj.m1844

MAS, M., GARCÍA-VICENTE, J.A., ESTRADA-GELONCH, A., PÉREZ-MAÑÁ, C., PAPASEIT, E., TORRENS, M. *et al.* (2022), Antidepressant Drugs and COVID-19: A Review of Basic and Clinical Evidence. Journal of Clinical Medicine 11(14): 4038.

MATSUYAMA, S., KAWASE, M., NAO, N., SHIRATO, K., UJIKE, M., KAMITANI, W. *et al.* (2020), The Inhaled Steroid Ciclesonide Blocks SARS-CoV-2 RNA Replication by Targeting the Viral Replication-Transcription Complex in Cultured Cells. Journal of Virology 95(1): e01648-20.

MEHRA, M.R., RUSCHITZKA, F. & PATEL, A.N. (2020), RETRACTED: Hydroxychloroquine or Chloroquine with or without a Macrolide for Treatment of COVID-19: A Multinational Registry Analysis. The Lancet 395(10240): 1820.

MEMORANDUM Explaining Basis for Declining Request for Emergency Use Authorization of Fluvoxamine Maleate [Internet] [cited 2022 Sep 27]. Available from: https://covid19.who.int/

MENDEL, A., BERNATSKY, S., THORNE, J.C., LACAILLE, D., JOHNSON, S.R. & VINET, É. (2021), Hydroxychloroquine Shortages during the COVID-19

Pandemic. Annals of the Rheumatic Diseases 80(3): 2020-2021.

MERCURO, N.J., YEN, C.F., SHIM, D.J., MAHER, T.R., MCCOY, C.M, ZIMETBAUM, P.J *et al.* (2020), Risk of QT Interval Prolongation Associated with Use of Hydroxychloroquine with or without Concomitant Azithromycin among Hospitalized Patients Testing Positive for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). JAMA Cardiology 25(9): 1036-1041.

MONAH, A., TIWARI, P., MENON-SURI, T., MITTAL, S., PATEL, A., JAIN, A. *et al.* (2021), Single-Dose Oral Ivermectin in Mild and Moderate COVID-19 (RIVET-COV): A Single-Centre Randomized, Placebo-Controlled Trial. Journal of Infection and Chemotherapy 27: 1743-1749.

MUNSHI, R., HUSSEIN, M.H., TORAIH, E.A., ELSHAZLI, R.M., JARDAK, C., SULTANA, N. *et al.* (2021), Vitamin D Insufficiency as a Potential Culprit in Critical COVID-19 Patients. Journal of Medical Virology 93(2): 733-740.

MURAI, I.H., FERNANDES, A.L., SALES, L.P., PINTO, A.J., GOESSLER, K.F., DURAN, C.S.C. *et al.* (2021), Effect of a Single High Dose of Vitamin D3 on Hospital Length of Stay in Patients with Moderate to Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial. JAMA 325(11): 1053-1060.

NATHAN, R., SHAWA, I., DE LA TORRE, I., PUSTIZZI, J.M., HAUSTRUP, N., PATEL, D.R. *et al.* (2021), A Narrative Review of the Clinical Practicalities of Bamlanivimab and Etesevimab Antibody Therapies for SARS-CoV-2. Infectious Diseases and Therapy 10(4): 1933-1947.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NIH Halts Clinical Trial of Hydroxychloroquine: Study Shows Treatment Does No Harm, but Provides no Benefit [Internet] [cited 2020 Jun 20]. Available from: www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-halts-clinical-trialhydroxychloroquine%0Aon-6-July-2020%0A

NAVARRO, M., CAMPRUBÍ, D., REQUENA-MÉNDEZ, A., BUONFRATE, D., GIORLI, G., KAMGNO, J. *et al.* (2020), Safety of High-Dose Ivermectin: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 75(4): 827-834.

NUJIĆ, K., BANJANAC, M., MUNIĆ, V., POLANČEC, D. & ERAKOVIĆ HABER, V. (2012), Impairment of Lysosomal Functions by Azithromycin and Chloroquine Contributes to Anti-Inflammatory Phenotype. Cellular Immunologu 279(1): 78-86.

O'BRIEN, M.P., FORLEO-NETO, E., MUSSER, B.J., ISA, F., CHAN, K-C., SARKAR, N. *et al.* (2021), Subcutaneous REGEN-COV Antibody Combination to Prevent COVID-19. New England Journal of Medicine 385(13): 1184-1195.

OESTEREICH, L., LÜDTKE, A., WURR, S., RIEGER, T., MUÑOZ-FONTELA, C. & GÜNTHER, S. (2014), Successful Treatment of Advanced Ebola Virus Infection with T-705 (Favipiravir) in a Small. Animal Model Antiviral Research 105(1): 17-21.

OLDENBURG, C.E., PINSKY, B.A., BROGDON, J., CHEN, C., RUDER, K., ZHONG, L. *et al.* (2021), Effect of Oral Azithromycin vs. Placebo on COVID-19 Symptoms in Outpatients with SARS-CoV-2 Infection: A Randomized Clinical Trial. JAMA 326(6): 490-498.

PAL, R., BANERJEE, M., BHADADA, S.K., SHETTY, A.J., SINGH, B. & VYAS, A. (2022), Vitamin D Supplementation and Clinical Outcomes in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Endocrinology Investigation 45(1): 53-68.

PARNHAM, M.J., HABER, V.E., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J., PERLETTI, G., VERLEDEN, G.M. & VOS, R. (2014), Azithromycin: Mechanisms of Action and Their Relevance for Clinical Applications. Pharmacology & Therapeutics 143(2): 225-245.

POPP, M., STEGEMANN, M., METZENDORF, M.I., KRANKE, P., MEYBOHM, P., SKOETZ, N. *et al.* (2021), Ivermectin for Preventing and Treating COVID-19. Cochrane Database Systematic Reviews 28(7): CD015017.

POSCHET, J., PERKETT, E., TIMMINS, G. & DERETIC, V. (2020), Azithromycin and Ciprofloxacin Have a Chloroquine-Like Effect on Respiratory Epithelial Cells. bioRxiv Prepr Serv Biol. 2020; DOI: 10.1101/2020.03.29.008631

PROMOTER OF THE STUDY: NUOVA F.I.O. (2020), (Italian Oxygen-Ozone Federation), Marini S., Maggiorotti M., Dardes N., Bonetti M., Martinelli M. *et al.* Oxygen-Ozone Therapy as Adjuvant in the Current Emergency in SARS-CoV-2 Infection: A Clinical Study. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents 34(3): 757-766.

QIAN, Z., ZHANG, Z., MA. H, SHAO, S., KANG, H. & TONG, Z. (2022), The Efficiency of Convalescent Plasma in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials. Frontiers in Immunology 13: 964398.

RAHIMI-LEVENE, N., SHAPIRA, J., TZUR, I., SHILOAH, E., PEER, V., LEVIN, E. *et al.* (2022), Predictors of Mortality in COVID-19 Patients Treated with Convalescent Plasma Therapy. PLoS One 17(7): e0271036.

RAHMANI, H., DAVOUDI-MONFARED, E., NOURIAN, A., KHALILI, H., HAJIZADEH, N., ALALABADI, N.Z. *et al.* (2020), Interferon β-1b in Treatment of Severe COVID-19: A Randomized Clinical Trial. International Immunopharmacology 88: 106903.

RAMAKRISHNAN, S., NICOLAU, D. V., LANGFORD, B., MAHDI, M., JEFFERS, H., MWASUKU, C. *et al.*

(2021), Inhaled Budesonide in the Treatment of Early COVID-19 (STOIC): A Phase 2, Open-Label, Randomised Controlled Trial. The Lancet Respiratory Medicine 9(7): 763-772.

RECOVERY Collaborative Group (2021), COLCHICINE in Patients Admitted to Hospital with COVID-19 (RECOVERY): A Randomised, Controlled, Open-Label, Platform Trial. The Lancet Respiratory Medicine 9(12): 1419-1426.

RECOVERY TRIAL, No Clinical Benefit from Use of Hydroxychloroquine in Hospitalised Patients with COVID-19 [Internet] [cited 2020 Jun 5]. Available from: www.recoverytrial.net/%0Anews/statement-from-the-chief-investigators-of-the-randomisedevaluation-%0Aof-COVID-19-therapy-recovery-trial-onhydroxychloroquine-%0A5-june-2020-no-clinical-benefit-from-use-ofhydroxychloroquine-%0Ain-hospitalised-patients-with-C

REIS, G., DOS SANTOS MOREIRA-SILVA, E.A., SILVA, D.C.M., THABANE, L., MILAGRES, A.C., FERREIRA, T.S. *et al.* (2022a), Effect of Early Treatment with Fluvoxamine on Risk of Emergency Care and Hospitalisation among Patients with COVID-19: The TOGETHER Randomised, Platform Clinical Trial. The Lancet Global Health 10(1): e42-51.

REIS, G., SILVA E.A.S.M., SILVA, D.C.M., THABANE, L., MILAGRES, A.C., FERREIRA, T.S. *et al.* (2022b), Effect of Early Treatment with Ivermectin among Patients with COVID-19. New England Journal of Medicine 386(18): 1721-1731.

REYES, A.Z., HU, K.A., TEPERMAN, J., WAMPLER MUSKARDIN, T.L., TARDIF, J.C., SHAH, B. *et al.* (2021), Anti-Inflammatory Therapy for COVID-19 Infection: The Case for Colchicine. Annales of the Rheumatic Diseases 80(5): 550-557.

RHODES, J.M., SUBRAMANIAN, S., LAIRD, E., GRIFFIN, G. & KENNY, R.A. (2021), Perspective: Vitamin D Deficiency and COVID-19 Severity – Plausibly Linked by Latitude, Ethnicity, Impacts on Cytokines, ACE2 and thrombosis. Journal of Internal Medicine 289(1): 97-115.

RODRIGUES, T.S., DE SÁ, K.S.G., ISHIMOTO, A.Y., BECERRA, A., OLIVEIRA, S., ALMEIDA L. *et al.* (2020), Inflammasomes Are Activated in Response to SARS-cov-2 Infection and Are Associated with COVID-19 Severity in Patients. Journal of Experimental Medicine 218(3): e20201707.

RODRÍGUEZ-OROZCO, A.R., JESICA, F.P. & JESSICA VA. (2010), Esteroides inhalados en asma. Aspectos farmacológicos que fundamentan su elección. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 41(3): 6-16.

ROMAN, Y.M., ALEJANDRA, B.P., PASUPULETI, V., PISCOYA, A., VIDAL, J.E. & HERNANDEZ, A.V. (2022), Ivermectin for the Treatment of Coronavirus Disease 2019: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Clinical Infectious Diseases 74(6): 1022-1029.

ROSENBERG, E.S., DUFORT, E.M., UDO, T., WILBERSCHIED, L.A., KUMAR, J., TESORIERO, J. *et al.* (2020), Association of Treatment with Hydroxychloroquine or Azithromycin with In-Hospital Mortality in Patients with COVID-19 in New York State. JAMA 323(24): 2493-2502.

ROWEN, R.J., ROBINS, H., CAREW, K., KAMARA, M.M. & JALLOH, M.I. (2016), Rapid Resolution of Hemorrhagic Fever (Ebola) in Sierra Leone with Ozone Therapy. African Journal of Infectious Diseases10(1): 49-54.

RUSSELL, C.D., FAIRFIELD, C.J., DRAKE, T.M., TURTLE, L., SEATON, R.A., WOOTTON, D.G. *et al.* (2021), Co-Infections, Secondary Infections, and Antimicrobial Use in Patients Hospitalised with COVID-19 during the First Pandemic Wave from the ISARIC WHO CCP-UK Study: A Multicentre, Prospective Cohort Study. The Lancet MICROBE 2(8): e354-e365.

SAAG, K.G., FURST, D.E., BARNES, P.J. (2018), Major Side Effects of Inhaled Glucocorticoids – UpToDate. UpToDate [Internet]. 2018; Available from: https://www.uptodate.com/contents/major-side-effects-of-inhaled-glucocorticoids

SALEH, M., GABRIELS, J., CHANG, D., KIM, B.S., MANSOOR, A., MAHMOOD, E. *et al.* (2020), The Effect of Chloroquine, Hydroxychloroquine and Azithromycin on the Corrected QT Interval in Patients with SARS-CoV-2 Infection. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 13(6): e008662.

SANDERS, J.M., MONOGUE, M.L., JODLOWSKI, T.Z. & CUTRELL, J.B. (2020), Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. JAMA 323(18): 1824-1836.

SCHREZENMEIER, E. & DÖRNER, T. (2020), Mechanisms of Action of Hydroxychloroquine and Chloroquine: Implications for Rheumatology. Nature Reviews Rheumatology 16(3): 155-166.

SELVARAJAN, S., ANANDARADJE, A., SHIVABASAPPA, S., MELEPURAKKAL SADANANDAN, D., NAIR, N.S. & GEORGE, M. (2022), Efficacy of Pharmacological Interventions in COVID-19: A Network Meta-Analysis. Brithis Journal of Clinical Pharmacology 88(9): 4080-4091.

SETYO BUDI, D., FAHMI ROFANANDA, I., REZA PRATAMA, N., SUTANTO, H., SUKMA HARIFTYANI, A., RATNA DESITA, S. *et al.* (2022), Ozone as an Adjuvant Therapy for COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. International Immunopharmacology 110: 109014.

SHAH, M., CAPTAIN, J., VAIDYA, V., KULKARNI, A., VALSANGKAR, K., NAIR, P.M. K. *et al.* (2021), Safety and Efficacy of Ozone Therapy in Mild to Moderate COVID-19 Patients: A Phase 1/11 Randomized Control Trial (SEOT Study). International Immunopharmacology 91: 107301.

ŞIMŞEK-YAVUZ, S. & KOMSUOĞLU ÇELIKYURT, F.I. (2021), An Update of Anti-Viral Treatment of COVID-19. Turkish Journal of Medical Sciences 51(S11): 3372-3390.

SINGH, B., RYAN, H., KREDO, T., CHAPLIN, M. & FLETCHER, T. (2021), Chloroquine or Hydroxychloroquine for Prevention and Treatment of COVID-19. Cochrane Database Systematic Reviews 2(2):CD013587.

SKIPPER, C.P., PASTICK, K.A., ENGEN, N.W., BANGDIWALA, A.S., ABASSI, M., LOFGREN, S.M. *et al.* (2020), Hydroxychloroquine in Nonhospitalized Adults with Early COVID-19: A Randomized Trial. Annals of Internal Medicine 173(8): 623-631.

SMOLDERS, J., VAN DEN OUWELAND, J., GEVEN, C., PICKKERS, P. & KOX, M. (2021), Letter to the Editor: Vitamin D Deficiency in COVID-19: Mixing Up Cause and Consequence. Metabolism 115: 154434.

SRINIVASAN, K. & RAO, M. (2021), Understanding the Clinical Utility of Favipiravir (T-705) in Coronavirus Disease of 2019: A Review. Therapeutics Advances in Infectious Diseases 8: 20499361211063016.

SUKHATME, V.P, REIERSEN, A.M., VAYTTADEN, S.J. & SUKHATME, V. V. (2021), Fluvoxamine: A Review of Its Mechanism of Action and Its Role in COVID-19. Frontiers in Pharmacology 12: 652688 (9 pp).

SULLIVAN, D.J., GEBO, K.A., SHOHAM, S., BLOCH, E.M., LAU, B., SHENOY, A.G. *et al.* (2022), Early Outpatient Treatment for COVID-19 with Convalescent Plasma. New England Journal of Medicine 386(18): 1700-1711.

TAKASHITA, E., KINOSHITA, N., YAMAYOSHI, S., SAKAI-TAGAWA, Y., FUJISAKI, S., ITO, M. *et al.* (2022), Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against COVID-19 Omicron Variant. New England Journal of Medicine 386(10): 995-998.

TANG, W., CAO, Z., HAN, M., WANG, Z., CHEN, J., SUN, W. *et al.* (2020), Hydroxychloroquine in Patients with Mainly Mild to Moderate Coronavirus Disease 2019: Open Label, Randomised Controlled Trial. BMJ 369: 1-11.

TARDIF, J.C., BOUABDALLAOUI, N., L'ALLIER, P.L., GAUDET, D., SHAH, B., PILLINGER, M.H. *et al.* (2021), Colchicine for Community-Treated Patients with COVID-19 (COLCORONA): A Phase 3, Randomised, Double-Blinded, Adaptive, Placebo-Controlled, Multicentre Trial. Lancet Respiratory Medicine 9(8): 924-932.

TEMPLE, C., HOANG, R. & HENDRICKSON, R.G. (2021), Toxic Effects from Ivermectin Use Associated with Prevention and Treatment of COVID-19. New England Journal of Medicine 385(23): 2197-2198.

THORBURN, K., HARIGOPAL, S., REDDY, V., TAYLOR, N. & VAN SAENE, H.K.F. (2006), High Incidence of Pulmonary Bacterial Co-Infection in Children with Severe Respiratory Syncytial Virus (RSV) Bronchiolitis. Thorax 61(7): 611-615.

TOURET, F., GILLES, M., BARRAL, K., NOUGAIREDE, A., DECROLY, E., LAMBALLERIE, X. de *et al.* (2020), In Vitro Screening of a FDA Approved Chemical Library Reveals Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Replication. Scientific Reports 10(1): 13093.

TRAN, D.H., SUGAMATA, R., HIROSE, T., SUZUKI, S., NOGUCHI, Y., SUGAWARA, A. *et al.* (2019), Azithromycin, a 15-Membered Macrolide Antibiotic, Inhibits Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Infection by Interfering with Virus Internalization Process. Journal of Antibiotics (Tokyo) 72(10): 759-768.

TYTECA, D., VAN DER SMISSEN, P., METTLEN, M., VAN BAMBEKE, F., TULKENS, P.M., MINGEOT-LECLERCQ, M.P. *et al.* (2002), Azithromycin, a Lysosomotropic Antibiotic, Has Distinct Effects on Fluid-Phase and Receptor-Mediated Endocytosis, but Does Not Impair Phagocytosis in J774 Macrophages. Experimental Cell Research 281(1): 86-100.

ULRICH, H. & PILLAT, M.M. (2020), CD147 as a Target for COVID-19 Treatment: Suggested Effects of Azithromycin and Stem Cell Engagement. Stem Cell Reviews and Reports. 16(3): 434-440.

VALLEJOS, J., ZONI, R., BANGHER, M., VILLAMANDOS, S., BOBADILLA, A., PLANO, F. *et al.* (2021), Ivermectin to Prevent Hospitalizations in Patients with COVID-19 (IVERCOR-COVID19) a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. BMC Infectious Dieases 21(1): 1-11.

VENA, A., CENDERELLO, G., BALLETTO, E., MEZZOGORI, L., SANTAGOSTINO BARBONE, A., BERRUTI, M. *et al.* (2021), Early Administration of Bamlanivimab in Combination with Etesevimab Increases the Benefits of COVID-19 Treatment: Real-World Experience from the Liguria Region. Journal of Clinical Medicine 10(20): 4682.

VINCENT, M.J., BERGERON, E., BENJANNET, S., ERICKSON, B.R., ROLLIN, P.E., KSIAZEK, T.G. *et al.* (2005), Chloroquine Is a Potent Inhibitor of SARS Coronavirus Infection and Spread. Virology Journal 2: 1-10.

WANG, M., CAO, R., ZHANG, L., YANG, X., LIU, J., XU, M. *et al.* (2020), Remdesivir and Chloroquine Effectively Inhibit the Recently Emerged Novel Coronavirus (2019-nCoV) In Vitro. Cell Research 30(3): 269-271.

WEBB, B.J., BUCKEL, W., VENTO, T., BUTLER, A.M., GRISEL, N., BROWN, S.M. *et al.* (2021), Real-World Effectiveness and Tolerability of Monoclonal Antibody Therapy for Ambulatory Patients with Early COVID-19. Open Forum Infectious Diseases 8(7): 1-9.

WHITE, J.H. (2022), Emerging Roles of Vitamin D-Induced Antimicrobial Peptides in Antiviral Innate Immunity. Nutrients 14(2): 284.

WILLIAMSON, E.J., WALKER, A.J., BHASKARAN, K., BACON, S., BATES, C., MORTON, C.E. *et al.* (2020), Factors associated with COVID-19-Related Death Using OpenSAFELY. Nature 584(7821): 430-436.

WHO Clinical Management (2021), Living Guidance COVID-19. World Heal Organ. (January).

WHO Solidaridity Trial Consortium (2021), Repurposed Antiviral Drugs for COVID-19 – Interim WHO Solidarity Trial Results. New England Journal of Medicine 384(6): 497-511.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2022), COVID-19 Weekly Epidemiological Update. World Heal Organ [Internet]. 2022;(June): 1-33. Available from: https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-weekly-epidemiological-update

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2020), WHO Discontinues Hydroxychloroquine and Lopinavir/Ritonavir Treatment Arms for COVID-19 [Internet] [cited 2020 Jul 4]. Available from: www.%0Awho.int/news-room/detail/04-07-2020-who-discontinueshydroxychloroquine-%0Aand-lopinavir-ritonavir-treatment-arms-for-%0ACOVID-19-on-6-July-2020%0A

YAO, X., YE, F., ZHANG, M., CUI, C., HUANG, B. & NIU, P. *et al.* (2020), In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Main Point: Hydroxychloroquine Was Found to Be More Potent than Chloroquine at Inhibiting SARS-CoV-2 In Vitro. Clinical Infectious Diseases 2: 1-25.

YU, L.M., BAFADHEL, M., DORWARD, J., HAYWARD, G., SAVILLE, B.R., GBINIGIE, O. *et al.* (2021), Inhaled Budesonide for COVID-19 in People at High Risk of Complications in the Community in the UK (PRINCIPLE): A Randomised, Controlled, Open-Label, Adaptive Platform Trial. The Lancet 398(10303): 843-855.

ZEIN, J.G., STRAUSS, R., ATTAWAY, A.H., HU, B. & MILINOVICH, A. (2022), Eosinophilia is Associated with Improved COVID-19 Outcomes in Inhaled Corticosteroid-Treated Patients. The Journal of Allergy and Clinical Immunology: in Practice 10(3): 742-750.

ZENG, S., MENG, X., HUANG, Q., LEI, N., ZENG, L., JIANG, X. *et al.* (2019), Spiramycin and Azithromycin, Safe for Administration to Children, Exert Antiviral Activity against Enterovirus A71 In Vitro and In Vivo. International Journal of Antimicrobial Agents. 53(4): 362-369.

ZHENG, Z., DONG, M. & HU, K. (2020), A Preliminary Evaluation on the Efficacy of Ozone Therapy in the Treatment of COVID-19. Journal of Medical Virology 92(11): 2348-2350.

ZHENG, S., MATZNELLER, P., ZEITLINGER, M. & SCHMIDT, S. (2014), Development of a Population Pharmacokinetic Model Characterizing the Tissue Distribution of Azithromycin in Healthy Subjects. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 58(11): 6675-6684.

ZIMMERMANN, P., ZIESENITZ, V.C., CURTIS, N. & RITZ, N. (2018), The Immunomodulatory Effects of Macrolides-A Systematic Review of the Underlying Mechanisms. Frontiers in Immunology 9: 302.

Capítulo XXIX

Respuesta a la pandemia en la Reglamentacion del medicamento. Excepciones para hacer frente a la pandemia que se pueden convertir en reglas

Emili Esteve Sala
Director del Departamento Técnico de Farmaindustria
Académico de número de la Real Academia de Farmacia de Cataluña

INTRODUCCIÓN

La experiencia vivida durante la pandemia COVID-19 ha demostrado la gran capacidad de adaptación que tenemos las personas.

En lo profesional, en el ámbito del medicamento, la adaptación a la pandemia ha buscado en todo momento dar una respuesta parecida a la situación preexistente. La investigación, la producción y el suministro de medicamentos se debía mantener en plena actividad. Ello ha sido posible gracias a la aplicación de ciertas excepciones a las reglas generales que fueron aceptadas por la Administración nacional y comunitaria, dada la situación existente y que se mostraron adecuadas (no faltaron medicamentos) para superar los momentos más críticos.

Estas excepciones, impensables antes de la pandemia, han funcionado. La pregunta que surge de inmediato es si ¿debemos volver a las normas precedentes o deberíamos aprender de la experiencia y adoptar algunos de los nuevos criterios?

La respuesta a esta pregunta no es nada fácil puesto que en muchas ocasiones el regulador puede considerar la excepción como una medida transitoria forzada por una situación concreta, como la pandemia. Pero en otras ocasiones, los agentes implicados: la industria farmacéutica, los profesionales de la medicina, de la farmacia y de las demás profesiones sanitarias, y hasta los propios pacientes y también la sociedad, pueden considerar apropiado que la situación provisional pase a ser definitiva y reemplace a la anterior.

Durante la pandemia hemos convertido las reuniones convencionales en virtuales, generalizamos el teletrabajo, suprimimos los viajes nacionales e internacionales y nos dimos cuenta de que muchas de nuestras actividades profesionales podían tomar otra dirección satisfactoria, puesto que la tecnología nos permitía hacerlo, sobradamente. Esto ha abierto un debate sobre cómo seguir en el adelante.

Del mismo modo ocurre en el caso del medicamento que, como es sabido, está extraordinariamente regulado en todas sus fases: investigación, producción, autorización y registro, financiación pública e intervención de precio, modificación de las condiciones de la autorización, suministro, farmacovigilancia, e incluso la cesación del mercado. Pues bien, durante la pandemia, se ha hecho necesario adaptar ciertas reglas de juego y adoptar medidas tanto a nivel nacional como de la Unión Europea (UE).

En este capítulo se pretende hacer un repaso de estas medidas, algunas ya definitivas, otras pendientes de adopción (o de abandono) en un momento especialmente importante puesto que estamos a las puertas de la modificación de la legislación general farmacéutica de la UE prevista para finales de 2022 (Comisión Europea, Unión Europea de la Salud). Tres áreas, de todas las posibles y por su trascendencia en los próximos años, serán consideradas:

i. investigación clínica,
ii. la fabricación y distribución de medicamentos y
iii. la normativa UE en respuesta a la pandemia.

1. LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA

La descripción de la situación de los hospitales durante la pandemia la vivimos a diario a través de los medios de comunicación que nos informaban de la remodelación completa de plantas de muchos hospitales o la adición de pabellones provisionales o de otras dependencias externas, para tratar de dar cobertura a los nuevos ingresos. Innumerables intervenciones quirúrgicas y visitas programadas suspendidas, sin posibilidad de acudir con normalidad a los centros sanitarios, había que encontrar una solución para que, en estas circunstancias, los ensayos clínicos con medicamentos, tanto los que ya estaban en curso como los nuevos que requería el tratamiento de la COVID-19, no se malograsen.

Era necesario que todos: profesionales sanitarios, participantes en los ensayos clínicos y promotores de la investigación (mayoritariamente compañías farmacéuticas), junto con las dos agencias reguladoras de la materia en sus respectivas competencias: la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y la Agencia Española de Protección de Datos (AEPD), se adaptaran de inmediato a la nueva situación, sin que la investigación se detuviera ni perdiera rigor.

Las dos agencias tuvieron un papel clave para que la investigación clínica en nuestro país durante la pandemia quedara protegida.

Por parte de la AEMPS se establecieron medidas que permitieron continuar con la realización de ensayos clínicos, incluyéndolas en el Documento de instrucciones de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios para la realización de ensayos clínicos en España (AEMPS 2021). Este documento que va actualizándose regularmente, incluyó un nuevo punto titulado «60. Medidas excepcionales aplicables a los ensayos clínicos para gestionar los problemas derivados de la emergencia por COVID-19».

La AEMPS como autoridad competente señala que: «Estas medidas están destinadas a preservar las actividades del ensayo en la medida de lo posible, garantizando la asistencia sanitaria de los pacientes, protegiendo su seguridad y bienestar y preservando la trazabilidad de las acciones implementadas en esta situación de emergencia sanitaria» abogando por la debida coordinación del investigador con el promotor para realizar un análisis de riesgos y priorizar las actividades que son críticas y la forma en que deberán llevarse a cabo. También la AEMPS recomienda que se tengan en cuenta en cada momento las medidas aplicadas en las distintas comunidades autónomas tras la declaración del estado de alerta. En aquellos momentos, había que centrase en actuar solo sobre lo imprescindible.

Las principales medidas que se adoptan en este ámbito se resumen en la tabla 1.

Por su parte, la AEPD realizó asimismo un importante esfuerzo para hallar una interpretación que permitiera el acceso remoto con verificación de datos fuente por parte de los monitores de los ensayos clínicos. La AEPD fue sensible a la situación en la que se encontraba la investigación clínica en nuestro país, considerando especialmente que en el ensayo no podía posponerse la verificación de datos fuente sin causar perjuicio a los participantes o a la integridad de estos. Naturalmente, se coordinó y tuvo en cuenta los criterios técnicos de la AEMPS así como el compromiso jurídico que adquirían las partes intervinientes en el ensayo, materializado en una cláusula modificativa del contrato en la que se reitera expresamente la responsabilidad del promotor en el cumplimiento de la normativa aplicable en materia de protección de datos personales.

En su informe la AEPD (2020) señala:

> Puesto que el promotor garantiza, como responsable del tratamiento de los datos del ensayo clínico, que el monitor llevará a cabo sus funciones conforme a los procedimientos normalizados de trabajo, accediendo únicamente a la información estrictamente necesaria para la realización de sus funciones (principio de minimización). Y, a tal efecto, suscribe con el monitor, encargado del tratamiento de los datos, el acuerdo de confidencialidad que consta como Anexo I, del que se entregará una copia firmada al centro, con carácter previo al inicio de las labores de monitorización en remoto. Finalmente, el promotor se compromete a cumplir la totalidad de las medidas implementadas por el centro en los términos establecidos en el protocolo de seguridad que se incorpora como Anexo II. Asumiendo, en consecuencia, la plena responsabilidad de las consecuencias que pudieran derivarse de dicho incumplimiento, entre las que estarían en su caso, las relacionadas con la normativa de protección de datos personales.

En estas circunstancias, la AEPD encontró la solución que permitía considerar cumplidos los requisitos de necesidad y proporcionalidad previstos en el Reglamento (UE) 2016/679 (2016) del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la Directiva 95/46/CE (RGPD) en el momento en que la solución se necesitaba, es decir: en plena pandemia. Muchos pacientes, investigadores y promotores se beneficiaron de esta actuación.

¿Qué debería hacerse en el futuro? ¿esta solución podría adoptarse de manera definitiva?

Desde luego la AEMPS (2021) señala en el Documento de Instrucciones antes citado que *«está trabajando en los estándares necesarios para que la monitorización remota con verificación de datos fuente pueda ser viable una vez superada la pandemia»*.

Tabla 1. Medidas excepcionales aplicables a los ensayos clínicos para gestionar los problemas derivados de la emergencia por COVID-19

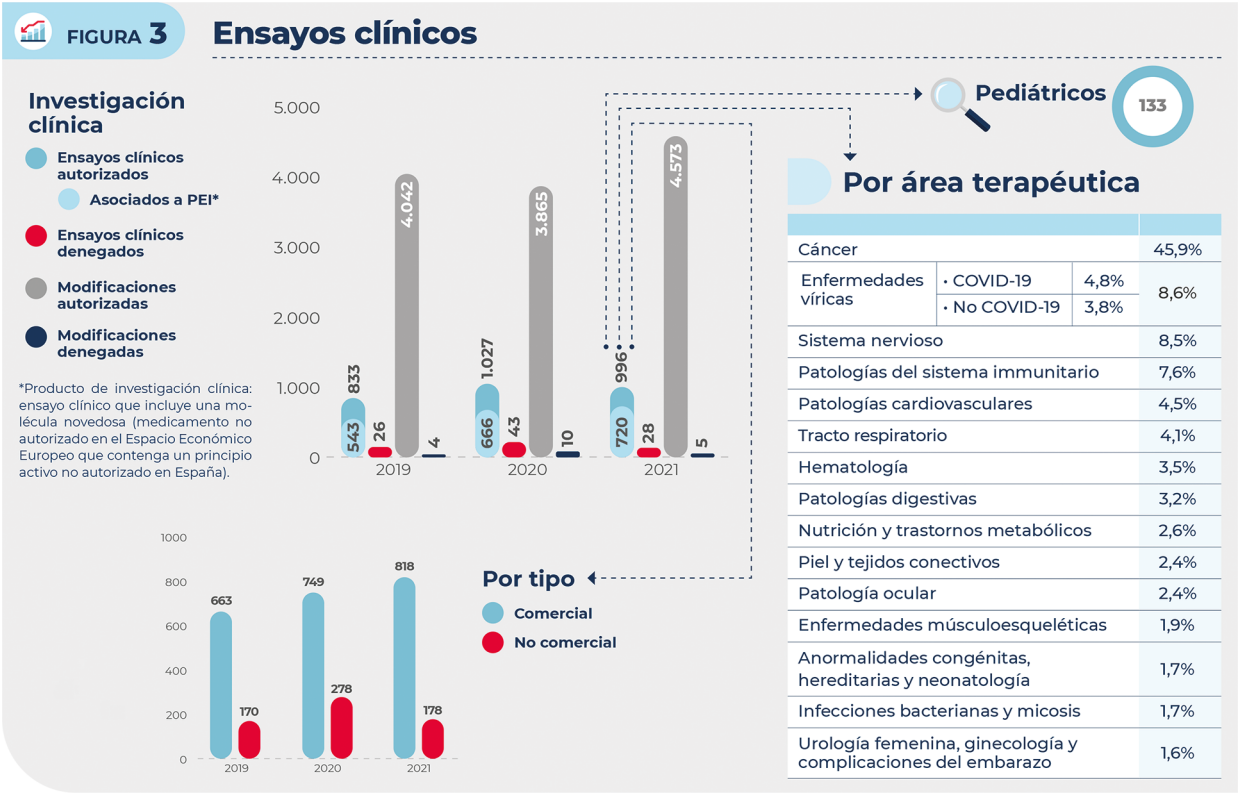
1. Visitas presenciales programadas	Promotor e investigador considerarán la conveniencia de posponer/reprogramar las visitas, o transformarlas en telefónicas. Las programadas *in situ* que sean críticas, se llevarán a cabo. Reprogramar no se considerará incumplimiento grave del protocolo a menos que pongan en riesgo la seguridad del paciente.
2. Reclutamiento de nuevos pacientes	Se podrá interrumpir el reclutamiento e incluso interrumpir el tratamiento (p. ej. en el caso de inmunosupresores) para evitar riesgos innecesarios y garantizar la mejor asistencia sanitaria posible a los pacientes, siempre tras valoración del beneficio/riesgo.
3. Acceso al tratamiento del ensayo	Garantizar en todo momento acceso de los pacientes a la medicación del ensayo. Opciones: i) mayor suministro durante las visitas, ii) dispensación a persona autorizada, iii) envío a domicilio (organizado por el Servicio de Farmacia, si procede, en colaboración con el promotor) asegurando conservación durante el transporte y la comunicación con el paciente para recepción y administración del tratamiento.
4. Consentimiento informado	*En estudios en COVID-19*. El consentimiento debe obtenerse preferiblemente por escrito. No obstante, puede obtenerse de manera oral y preferiblemente ante un testigo, documentándolo en la historia clínica y ratificándolo posteriormente por escrito mediante la firma del paciente y del investigador. *En estudios ya iniciados para poder continuar en el estudio*. Preferiblemente por escrito. No obstante, para evitar que el paciente tenga que dirigirse a los centros para la firma, se permite la obtención oral (por teléfono o video-llamada, por ejemplo), documentándolo en la historia clínica y ratificándolo posteriormente por correo electrónico o por mensajería.
5. Visitas de monitorización	Adaptación de los planes de monitorización (priorizando monitorización centralizada y remota). La verificación remota de datos fuente podrá considerarse para todos los ensayos clínicos en marcha siempre conforme a las directrices de la UE (Comisión Europea, Guidance 2022) y requisitos de la AEPD (2020). No se requerirá aprobación previa de una modificación sustancial por el CEIm, ni autorización de la AEMPS, ni consentimiento expreso del paciente. Los cambios adoptados se documentarán, mantendrán en el archivo del ensayo clínico y pondrán a disposición de la AEMPS, en caso de ser requeridos.
6. Transferencia de pacientes de unos centros a otros	El traslado de un paciente de un centro a otro centro del ensayo podrá realizarse siempre que: a) se firme un acuerdo de transferencia entre centros b) el nuevo centro tenga acceso al cuaderno de recogida de datos y a la historia clínica del paciente c) el centro original envíe un informe de transferencia que resuma los datos médicos más relevantes del paciente d) la transferencia del paciente quede documentada en el archivo del ensayo de los dos centros.
7. Notificaciones al CEIm y a la AEMPS	El promotor deberá elaborar un informe sobre todas las medidas excepcionales adoptadas. Los cambios que se realicen en los estudios y no afecten al bienestar y/o la seguridad de los pacientes, o a la calidad de los datos no deben tramitarse como modificación relevante. En cuanto a las medidas urgentes, no requerirán notificación individual en 15 días: — El envío de los medicamentos a domicilio. — La realización de pruebas en un laboratorio local en vez de en el centro previsto. — La transferencia de pacientes de un centro del ensayo a otro centro del ensayo.

Fuente: Elaboración propia a partir del Documento de instrucciones de la AEMPS para la realización de ensayos clínicos en España (AEMPS 2021)

Por su parte, la AEPD, se ha manifestado en su Memoria 2021 (AEPD 2021) de una manera clara, concluyendo que «*la monitorización remota de los ensayos clínicos con posterioridad a la pandemia de la COVID-19 es compatible con el RGPD, debiendo quedar la decisión sobre su utilización al criterio de las autoridades sanitarias competentes, que en ese momento optaban por dicha opción a fin de facilitar el desarrollo en los ensayos clínicos en el futuro*».

La posición de la industria farmacéutica como principal promotora en la realización de ensayos clínicos (fig. 1), firmemente apoyada por los centros sanitarios, es la decidida apuesta, como es lógico, por la consolidación de la monitorización remota de datos fuente en nuestro país en todas las circunstancias.

La experiencia de la pandemia en investigación clínica, especialmente el salto digital que ha supuesto puede ser de utilidad en el plan de modernización que busca transformar la manera en la que se inician, diseñan y desarrollan los ensayos clínicos. Este plan de trabajo 2022-2026 conocido como ACT EU (Accelerating Clinical Trials in the EU) (Comisión Europea, HMA, EMA 2022) ha sido



Cáncer			45,9%
Enfermedades víricas	· COVID-19	4,8%	8,6%
	· No COVID-19	3,8%	
Sistema nervioso			8,5%
Patologías del sistema immunitario			7,6%
Patologías cardiovasculares			4,5%
Tracto respiratorio			4,1%
Hematología			3,5%
Patologías digestivas			3,2%
Nutrición y trastornos metabólicos			2,6%
Piel y tejidos conectivos			2,4%
Patología ocular			2,4%
Enfermedades músculoesqueléticas			1,9%
Anormalidades congénitas, hereditarias y neonatología			1,7%
Infecciones bacterianas y micosis			1,7%
Urología femenina, ginecología y complicaciones del embarazo			1,6%

Figura 1. Datos sobre número, tipo y área terapéutica de ensayos clínicos en España. Fuente: AEMPS. Memoria 2021 (AEMPS 2021)

elaborado por la Comisión Europea, la Red de Jefes de Agencias de Medicamentos (HMA, por sus siglas en inglés) y la Agencia Europea del Medicamento con el propósito es seguir situando a la Unión Europea como centro de la investigación clínica, promover el desarrollo de medicamentos de calidad, seguros y eficaces, así como una mayor integración de la investigación clínica en el sistema de salud europeo.

2. LA FABRICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MEDICAMENTOS

Durante la pandemia, la industria farmacéutica se encontró con la obligación, completamente lógica, de fabricar y distribuir medicamentos y vacunas (conforme se fueran aprobando) para satisfacer las necesidades de la población afectada por COVID-19 sin dejar de lado todos los demás medicamentos.

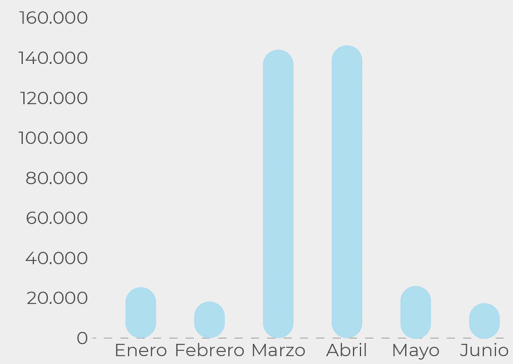
En septiembre de 2020, el entonces Presidente de Farmaindustria, Martín Sellés, señalaba en la conferencia inaugural del XX Encuentro de la Industria Farmacéutica en la UIMP (Farmaindustria 2020) lo siguiente:

> desde el primer día de la crisis hemos sido considerados sector esencial y por tanto han sido unos meses complicados de mucho trabajo. En primer lugar, hemos conseguido que todos los españoles tuvieran, cada día, sus medicamentos para sus enfermedades habituales. Para su diabetes, para su cáncer, para su leucemia, para su esquizofrenia o para su hipertensión. 25 millones de españoles tomamos medicamentos cada día, y esos 25 millones de españoles han tenido cada día los medicamentos que necesitaban.
> Las 82 plantas de producción de medicamentos que tenemos en nuestro país han funcionado a pleno rendimiento con unos planes de contingencia robustos que han funcionado adecuadamente, y también hemos trabajado para que los medicamentos que se producen fuera de España llegarán a nuestro país en tiempo y forma, evitando acopios por parte de terceros países. Les puedo asegurar que, en un entorno «de guerra», esto no ha sido fácil, pero lo hemos conseguido.
> Hemos conseguido también que algunas de nuestras plantas de producción se adaptarán para producir medicamentos específicos para la lucha frente a la COVID. Por ejemplo, para producir medicamentos necesarios en las Unidades de Cuidados Intensivos.
> La coordinación con el Ministerio de sanidad y con la Agencia Española de medicamentos, así como con distribuidores y farmacias, ha sido ejemplar. El ministro de Sanidad y la directora de la Agencia lo han destacado en repetidas ocasiones.

Desde el inicio de la pandemia, la AEMPS se venía reuniendo semanalmente con representantes de los agentes de la cadena del medicamento en el ámbito de la dispensación (Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos) de la distribución (FEDIFAR) y de la

FIGURA 3

Datos de venta de medicamentos con principio activo cisatracurio en el primer semestre de 2020



Los medicamentos que más tensión experimentaron fueron los bloqueantes neuromusculares, como el cisatracurio (su consumo se multiplicó por 6) o el rocuronio (por 2,5), esenciales para poder emplear ventilación mecánica en los pacientes. El consumo de medicamentos sedantes u opioides se acentuó también considerablemente, como el propofol (por 3), el midazolam (por 2) o el remifentanilo y fentanilo (por 2-3). El incremento del consumo de estos medicamentos alcanzó su punto máximo durante la cuarta semana del mes de marzo, y se mantuvo elevado en los meses de abril y mayo.

Figura 2. Ejemplo del incremento de cis-atracurio en el primer semestre de la pandemia. Fuente AEMPS (2020)

fabricación de medicamentos (AESEG y FARMAINDUSTRIA) para hacer un seguimiento de las necesidades sanitarias de medicamentos, especialmente los que mayor demanda experimentaron en los hospitales.

Se reguló, expresamente, la actuación de la industria farmacéutica para garantizar el suministro de los denominados medicamentos esenciales en COVID-19, pero no se intervino al sector. La no intervención fue un elemento clave en la actuación de las autoridades.

En efecto, la normativa promulgada el 14 de marzo de 2020 (Real Decreto 463/2020), contemplaba una serie de medidas dirigidas a proteger la salud y seguridad de los ciudadanos, contener la progresión de la enfermedad y reforzar el sistema de salud pública habilitando a las autoridades competentes delegadas para dictar las órdenes, resoluciones, disposiciones e instrucciones interpretativas que, en la esfera específica de su actuación, fueran necesarias para garantizar la prestación de todos los servicios, ordinarios o extraordinarios, en orden a la protección de personas, bienes y lugares, mediante la adopción de cualquiera de las medidas previstas en el art. 11 de la Ley Orgánica 4/1981, de 1 de junio, de los estados de alarma, excepción y sitio (Ley Orgánica 4/1981).

Por otra parte, la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, aprobado por Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio (Real Decreto Legislativo 1/2015), habilitaba al Gobierno a adoptar medidas especiales en relación con la fabricación, importación, distribución y dispensación de medicamentos, para asegurar el abastecimiento de los mismos, correspondiendo la adopción de tales medidas en la actual situación de estado de alarma al Ministro de Sanidad.

En pleno estado de alarma, se podía haber producido una verdadera intervención sectorial. Sin embargo, el diálogo semanal que se estableció entre los agentes de la cadena recomendó que fuera el propio sector quien aplicara sus planes de contingencia garantizando una distribución segura de los medicamentos. El argumento tenido en cuenta fue que el *expertise* de la distribución de medicamentos no residía en la Administración sino en las compañías farmacéuticas y en los almacenes mayoristas y quien mejor podría regularlo serían estos agentes y no otros.

Esta solución pragmática, aceptada por las autoridades desde el principio, circunscribió la intervención de la AEMPS a los medicamentos esenciales y dentro de los esenciales a los que mayor incremento del consumo experimentaron (fig. 2).

Para los restantes medicamentos fueron las propias compañías quienes regularon los suministros en un momento en el que la demanda, especialmente de medicamentos dispensación hospitalaria para uso ambulatorio, se podría haber duplicado o triplicado para tratar de reducir la frecuencia con la que los pacientes acudían a los hospitales a recoger medicación, dado el riesgo y las dificultades que ello entrañaba en aquellos momentos. Por otra parte, la industria farmacéutica no podía suministrar tales cantidades de medicamentos a los centros hospitalarios ni era conveniente (a veces no era posible por diferentes causas, incluida el temor a acudir a los hospitales) que los pacientes frecuentaran los centros para recoger la medicación. Así, se idearon distintas formas de distribución de medicamentos, salvaguardando las cantidades de distribución.

La situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19 identificó dos excepciones que posiblemente se mantendrán. La primera, la importancia de tener identificados una relación de medicamentos esenciales. La segunda, la importancia de disponer de una vía para hacer llegar a los pacientes directamente medicación hospitalaria.

2.1. Medicamentos esenciales/estratégicos

La AEMPS tenía la plena capacidad para haber exigido que los laboratorios dispusieran de existencias de una serie de presentaciones que consideraba esenciales para hacer frente a la pandemia. Pero no adoptó ninguna medida impositiva. En esos momentos probablemente no habría sido efectiva, puesto que la demanda de algunos de estos principios activos fue mundial, lo que produjo una extraordinaria escasez y un desmedido incremento del precio.

En lugar de exigir un acopio de existencias, la AEMPS estableció la obligación de disponer de información actualizada sobre la disponibilidad real y la previsión de fabricación de determinados medicamentos que considera esenciales. Igualmente, para proteger la salud pública, reguló el abastecimiento de estos medicamentos a centros y servicios sanitarios mediante una distribución diaria capaz de cubrir el consumo con la agilidad necesaria.

Una información puntual tenía también mucho valor, especialmente puesto que se debía suministrar y actualizar diariamente a la AEMPS por vía electrónica las existencias disponibles de medicamentos esenciales, la cantidad suministrada en las últimas veinticuatro horas y la previsión de liberación y recepción de lotes (fechas y cantidades).

Respecto a la obligación de abastecimiento, cada compañía debía garantizarlo (incluidos períodos vacacionales y fines de semana), sabiendo que de no hacerlo, se le podría exigir una frecuencia tasada de suministro de una vez al día.

En relación a la priorización de la producción, se contempló también en la norma (Ley Orgánica 4/1981), aunque no tenemos constancia de que se hubiera ejecutado la posibilidad de ordenar la priorización de la fabricación de los medicamentos esenciales por parte del Ministro de Sanidad. En la práctica, las producciones de medicamentos para cubrir necesidades específicas fueron acordadas entre los fabricantes que operaban en nuestro país y la AEMPS. De ahí la importancia que ha tenido para hacer frente a la pandemia la existencia de plantas de producción radicadas en nuestro territorio (Coca 2020).

El denominado Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia de la Economía, *España Puede*, presentado por el Gobierno de España (2021b), en su Componente 18 (C18.R5) Reforma de la regulación de medicamentos y mejora del acceso a medicamentos prevé el «fortalecimiento de una cadena de producción y suministro robusta y resiliente capaz de enfrentarse a crisis de salud y contribuir a la suficiencia de Unión Europea». Se señala que esta actuación se enmarcaría en un Plan estratégico de la Industria Farmacéutica: «Dentro de las reformas que se van a poner en marcha en el ámbito farmacéutico destaca también la elaboración de un Plan Estratégico de la Industria Farmacéutica, en el que ya están trabajando los Ministerios de Sanidad, Industria y Ciencia e Innovación, manteniendo contactos con el sector. Este Plan tendrá como pilares básicos: 1) el acceso de los pacientes, la cobertura de necesidades médicas no cubiertas y la sostenibilidad del SNS; 2) el fomento de la competitividad, la innovación y el desarrollo; y 3) asegurar una cadena de suministros sólida, resiliente y ecosostenible».

En respuesta a un anuncio público de presentación de Manifestaciones de Interés (MDI) del Ministerio de Industria, Comercio y Turismo (MINCOTUR) dentro del Programa de Impulso de proyectos tractores de Competitividad y Sostenibilidad Industrial (MINCOTUR 2020), Farmaindustria (2021) lideró un proyecto que suponía una inversión en tres años de 1720 millones de euros (dos terceras partes de la inversión serían acometidas por empresas fabricantes de medicamentos y una tercera parte por empresas de materias primas farmacéuticas).

El proyecto, denominado MedEst (Medicamentos esenciales y capacidades industriales estratégicas) tenía como objetivo precisamente dotar a la industria española de las capacidades de conocimiento, de tecnología, digitalización y manufactureras para asegurar en España el suministro y desarrollo de los medicamentos esenciales o estratégicos y así disponer de capacidades para hacer frente con garantías a necesidades sanitarias (fig. 3).

El proyecto MedEst no ha podido ser desarrollado por el momento puesto que la prioridad del gobierno se centró en un Proyecto Estratégico para la Recuperación y Transformación Económica (PERTE) denominado «PERTE para la Salud de Vanguardia» (Gobierno de España 2021) mucho más orientado al desarrollo de terapias avanzadas y otros fármacos innovadores, que a los medicamentos estratégicos. Sin embargo, MedEst ha contribuido a difundir el concepto de medicamento estratégico y capacidades estratégicas de fabricación.

Este PERTE contiene, no obstante, algunas actuaciones relacionadas con la innovación y el fortalecimiento industrial (línea transversal 2) que ha dado lugar a una convocatoria por parte del MINCOTUR (2022) centrada en aumentar sustancialmente la sostenibilidad medioambiental de las empresas (como la descarbonización, la reducción de la contaminación y la economía circular) y la eficiencia energética, aspectos muy distantes de

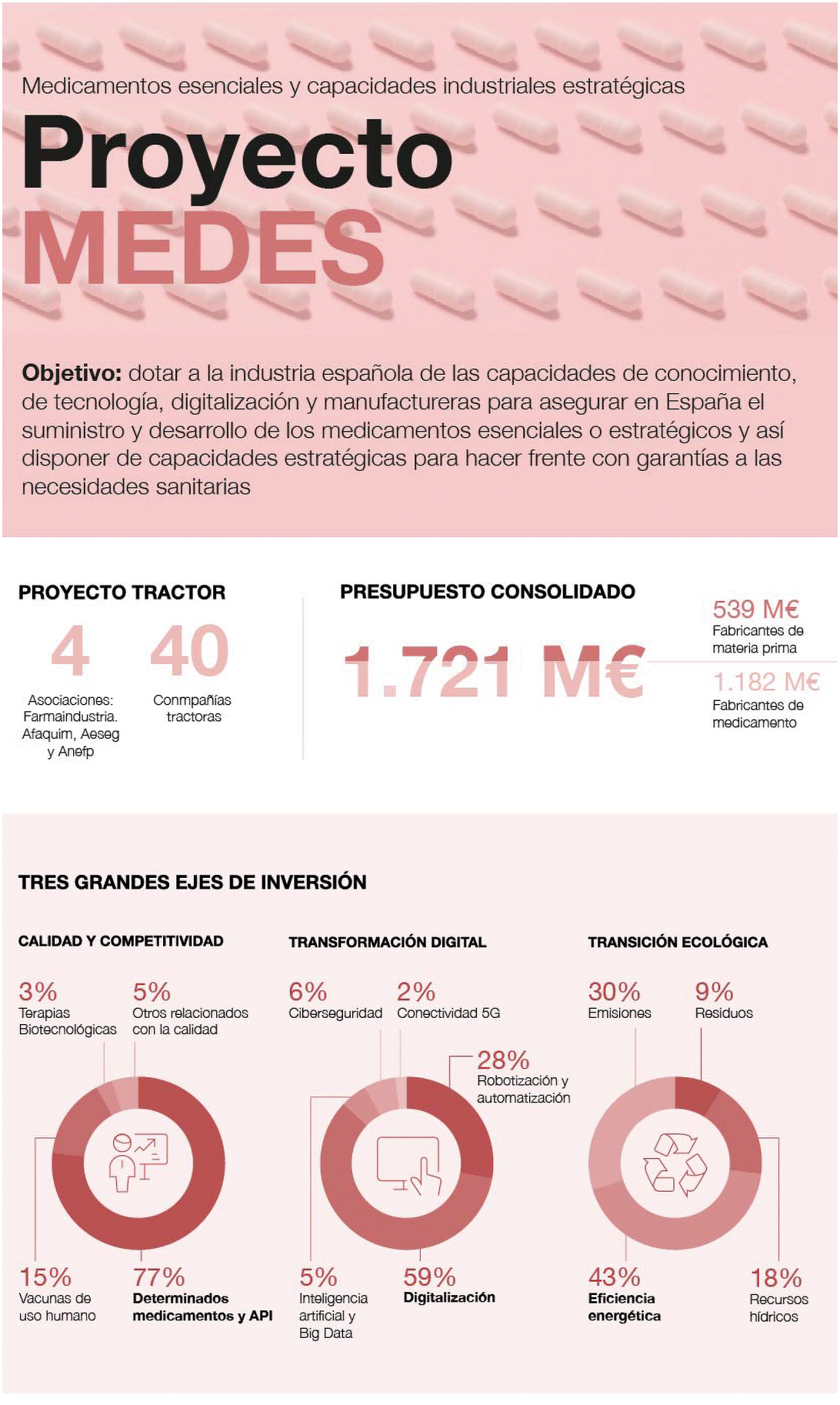


Figura 3. Proyecto MedEst. Resumen. Fuente: Farmaindustria

los planteamientos de la industria sobre medicamentos esenciales y consolidación de capacidades industriales. Si bien es específica para empresas del sector de los medicamentos y productos sanitarios, esta convocatoria de 2022 ofrece ayudas en forma de préstamo, subvención o de una combinación de ambas modalidades. El importe total máximo convocado será de 50 millones euros de los que 25 millones de euros serán en forma de préstamos y 25 millones de euros en forma de subvención. La financiación total para conceder será como máximo del 80 por ciento del presupuesto financiable (Orden de 6 de mayo de 2022).

Aunque no ligados a los PERTES, la idea de disponer en nuestro país de una relación de medicamentos esenciales/estratégicos estaba ya consolidada. En primer lugar, porque ya existía una relación de medicamentos esenciales que se había publicado en junio de 2020 (Resolución de 19 de junio de 2020) y actualizado posteriormente por la AEMPS en cuatro ocasiones, la última de en junio de 2022 (Resolución de 17 de mayo de 2022). Como esta relación se refería únicamente a los tratamientos COVID-19, sin considerar otros medicamentos igualmente esenciales o estratégicos, debía completarse. En segundo lugar, porque se había demostrado que este tipo de medicamentos son fundamentales en determinadas circunstancias y por tanto, deben ser protegidos para contribuir a su permanencia en el mercado español.

De nuevo, la pandemia ha puesto de manifiesto la existencia de este tipo de medicamentos y la importancia que tienen. Aunque queda mucho por hacer, se han dado dos importantes pasos en defensa de los medicamentos estratégicos.

El primero, por parte del MINCOTUR, mediante una valoración positiva de las empresas que se presentan al programa PROFARMA la fabricación de estos medicamentos con una puntuación adicional «Como novedades en línea con la nueva Estrategia Farmacéutica para Europa, de noviembre de 2020, el programa PROFARMA (2021-2022) quiere reforzar la valoración de la fabricación de medicamentos considerados esenciales o estratégicos, .../...» (MINCOTUR 2021).

El segundo, por parte de la AEMPS, que ha invertido mucho esfuerzo en publicar en mayo de 2022 la primera relación definiendo los como Medicamentos estratégicos como: «un subgrupo de los medicamentos críticos para los que se considera necesario adoptar medidas adicionales, bien regulatorias, económicas o de otra índole para garantizar su mantenimiento en el mercado tanto por su necesidad para la atención básica de la salud como por la vulnerabilidad de su cadena de suministro» (AEMPS 2022).

La relación de medicamentos estratégicos en su primera actualización, de 21 de julio, comprendía 475 descripciones clínicas de producto (principio activo, dosis, unidad de dosis y forma farmacéutica) que contenían 254 principios activos y que se correspondían con 1321 presentaciones autorizadas de medicamentos. Tras la actualización de 22 de julio de 2023 la lista se ampliado a 1387 presentaciones de medicamentos distribuidas en 557 descripciones clínicas de producto que corresponden a 317 principios activos o combinaciones entre estos.

2.2. Distribución de medicamentos ambulatorios de dispensación hospitalaria

Entre las normas que ha generado la pandemia se incluye, de manera coyuntural, la posibilidad de incorporar al proceso de dispensación la aplicación de las tecnologías de la información y la comunicación. La finalidad es garantizar una atención y seguimiento farmacoterapéutico óptimo y acercar la medicación al paciente cuando situaciones como las que se han producido en esta crisis de salud pública o bien en el caso de personas en especial situación de vulnerabilidad, personas mayores, enfermas y dependientes, lo aconsejen.

El preámbulo de la Ley 2/2021, de 29 de marzo, de medidas urgentes de prevención, contención y coordinación para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19 (Ley 2/2021) justifica esta posibilidad de dispensación por la experiencia trasladada por todas las comunidades autónomas en el seno de la Comisión Permanente de Farmacia, que evidenció de forma unánime, que esta medida impulsada en el estado de alarma supuso un progreso en la gestión de la prestación farmacéutica con efectos positivos en la población y es necesario mantenerla mientras perviva esta situación de crisis sanitaria no solo para colectivos vulnerables que no tengan visitas programadas en el hospital, sino extenderla también a aquellas personas cuya situación clínica, de dependencia, vulnerabilidad, riesgo o de distancia al centro lo requiera.

La Disposición adicional quinta señala, entre otras, cuestiones que hasta que el Gobierno declare la finalización de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19, cuando exista una situación excepcional sanitaria, con el fin de proteger la salud pública, o bien cuando la situación clínica, de dependencia, vulnerabilidad, riesgo o de distancia física del paciente a los centros así lo requiera, los órganos, o autoridades competentes de la gestión de la prestación farmacéutica de las comunidades autónomas podrán establecer las medidas oportunas para la dispensación de medicamentos en modalidad no presencial, garantizando la óptima atención con la entrega, si procede, de los medicamentos en centros sanitarios o, en establecimientos sanitarios autorizados para la dispensación de medicamentos próximos al

domicilio del paciente, o en su propio domicilio. El suministro de los medicamentos hasta el lugar de destino, así como el seguimiento farmacoterapéutico será responsabilidad del servicio de farmacia dispensador. El transporte y entrega del medicamento deberá realizarse de manera que se asegure que no sufre ninguna alteración ni merma de su calidad.

La opción de la entrega domiciliaria de medicamentos de dispensación hospitalaria que se inició en marzo de 2020 por Orden ministerial (Orden SND/293/2020) determinó que la mayoría de las CCAA buscaran soluciones regionales para que, entonces, de forma excepcional, diera cumplimiento a lo previsto en el punto tercero de la Orden:

> *Tercero. Dispensación de medicación de dispensación hospitalaria a pacientes no hospitalizados.*
> De forma excepcional el órgano competente en materia de prestación farmacéutica de la comunidad autónoma podrá establecer las medidas oportunas para garantizar la dispensación de los medicamentos de dispensación hospitalaria sin que deban ser dispensados en las dependencias del hospital.

En algunas CCAA, parece que esta actuación excepcional puede convertirse en regla. Un ejemplo reciente es el de Andalucía donde el Servicio Andaluz de Salud ha firmado convenios con compañías farmacéuticas para la puesta en marcha «de un programa de envío de medicación de dispensación hospitalaria a domicilio para determinados pacientes externos de los servicios de Farmacia Hospitalaria de nueve hospitales andaluces: Torrecárdenas, en Almería; Hospital de Jerez, en Cádiz; Reina Sofía de Córdoba; Virgen de las Nieves de Granada; Regional y Clínico de Málaga, y Virgen del Rocío, Macarena y Valme de Sevilla» (Servicio Andaluz de Salud 2021a). Con posterioridad, estos convenios han ido sucediéndose con objetivos en la misma línea y sin referencias a centros. Así los convenios firmados por el SAS y las compañías farmacéuticas permiten poner en marcha «un programa de dispensación personalizada de medicamentos de prescripción hospitalaria en pro de dar respuesta a la situación que viven aquellos pacientes que, por su baja movilidad, por su aislamiento geográfico o social, tienen difícil el acceso al hospital donde deberían recibir la medicación que necesitan» (Servicio Andaluz de Salud 2022b) o bien «un programa de envío de medicación de dispensación hospitalaria a domicilio para determinados pacientes externos de los servicios de Farmacia Hospitalaria, con especial atención a pacientes afectados por enfermedades crónicas» (Servicio Andaluz de Salud 2021a; Servicio Analuz de Salud 2022a).

No será una sorpresa que la pandemia consolide una práctica excepcional como definitiva. No solo porque tiene la aceptación de las CCAA sino porque el propio gobierno ha expresado en el componente 18: Renovación y ampliación de capacidades del Sistema Nacional de Salud del Plan de Recuperación Transformación y Resiliencia (Gobierno de España 2021b) que transcurridos casi seis años desde la última modificación del Texto Refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, es necesario afrontar una nueva modificación de la norma reguladora para adecuar la normativa a las necesidades y desafíos actuales y futuros en materia de política farmacéutica del Sistema Nacional de Salud. Entre los principales objetivos de esta modificación se incluye: «Consolidar la dispensación no presencial de medicamentos de dispensación hospitalaria y la telefarmacia».

Así, se añade al Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio (Real Decreto Legislativo 1/2015), con fecha de entrada en vigor el 30 de junio del 2023, un nuevo párrafo 8.º a su art. 3:

> 8. Cuando concurran circunstancias sanitarias excepcionales o cuando la situación clínica de dependencia, vulnerabilidad, riesgo o distancia física del paciente a los centros indicados en los párrafos b) y c) del apartado 6 del presente artículo así lo requiera, los órganos o autoridades competentes de las comunidades autónomas podrán establecer medidas para la dispensación de medicamentos y productos sanitarios en modalidad no presencial, garantizando una atención óptima con la entrega, si procede, de los medicamentos en establecimientos sanitarios autorizados para la dispensación de medicamentos y productos sanitarios próximos al domicilio del paciente o en su propio domicilio.
> El suministro de los medicamentos y productos sanitarios hasta el lugar de destino y su seguimiento farmacoterapéutico serán responsabilidad del servicio de farmacia dispensador. El transporte y la entrega del medicamento y de los productos sanitarios deberán garantizar condiciones adecuadas de conservación y custodia, sin alteración o merma de su calidad.

3. LA NORMATIVA DE LA UE

La pandemia de COVID-19 puso de manifiesto la necesidad de una acción coordinada a escala de la Unión para responder a las emergencias sanitarias. Esto desencadenó una serie de acciones con vocación de permanencia. Naturalmente se trataba de aprender de la situación vivida y tratar de evitar situaciones futuras.

A la luz de la experiencia adquirida en los primeros meses de la pandemia de COVID-19, la presidenta de la Comisión, Ursula von der Leyen pidió en el discurso sobre el estado de la Unión el 16 de septiembre de 2020 (Comisión Europea 2020d) extraer lecciones de la crisis y construir una Unión Europea de la Salud, que incluyese

una estructura europea específica para la investigación y desarrollo biomédico avanzado, a fin de reforzar la capacidad y la disposición para responder a las amenazas para la salud y las emergencias transfronterizas.

Era evidente la necesidad de una mejor planificación para futuras pandemias y para ello debía aumentar la capacidad de preparación y respuesta de la UE. En noviembre de 2020 se produjo la Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones titulada: *Construir una Unión Europea de la Salud: reforzar la resiliencia de la UE ante las amenazas transfronterizas para la salud* (Comisión Europea 2020a) donde la Comisión señalaba algunas de las amenazas que cara a futuro deberán ser tenidas en cuenta como el aumento de las probabilidades de que se produjeran brotes recurrentes de enfermedades transmisibles, la resistencia a los antimicrobianos, las presiones sobre la biodiversidad y el cambio climático.

La Comunicación reconocía, por otra parte, que la pandemia había puesto de manifiesto «debilidades estructurales y fallos del mercado en nuestras previsiones, preparación y capacidad para responder de forma coherente, rápida y adecuada para proteger a nuestros ciudadanos frente a las crisis sanitarias». Consideraba, asimismo, que los cambios en las estructuras demográficas, en particular el envejecimiento de nuestra población, provocan cambios en las vulnerabilidades en materia de salud y en los modelos de enfermedades, que debe llevarnos a «un enfoque sistémico y prospectivo que reconozca la interacción entre la salud humana y animal y el medio ambiente para desarrollar soluciones estructurales preparadas para el futuro y coherentes con el concepto "Una sola salud"».

En el punto 10 de esta Comunicación, la Comisión europea señalaba inequívocamente la necesidad de disponer de una Autoridad Europea de Preparación y Respuestas Sanitarias (HERA por sus siglas en inglés):

> Es improbable que la COVID-19 sea la única crisis sanitaria mundial o paneuropea de nuestro siglo. Esta previsión requiere una autoridad europea específica que refuerce la capacidad de preparación y respuesta de la UE frente a las amenazas transfronterizas para la salud humana tanto nuevas como emergentes.
>
> La misión de la autoridad será capacitar a la UE y a sus Estados miembros para desplegar rápidamente las medidas médicas y de otra índole más avanzadas en caso de emergencia sanitaria mediante la cobertura de toda la cadena de valor, desde la concepción, pasando por la distribución y el uso.

Además de la creación de la HERA, la Comisión impulsaría mandatos ampliados y mejorados en caso de crisis para el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades, la Agencia Europea de Medicamentos y contemplaría medidas de cara a la Estrategia Farmacéutica para Europa.

3.1. HERA. Autoridad Europea de Preparación y Respuestas Sanitarias

Aunque la conveniencia de disponer de una Autoridad Europea de Preparación y Respuestas Sanitarias (HERA por sus siglas en inglés) era evidente, las necesidades sobrevenidas y súbitas para hacer frente a la pandemia que acuciaban a los Estados miembros y a la propia UE en su conjunto llevaban a la adopción de respuestas en forma de instrumentos que continuamente se adelantaban a su constitución formal.

Se partía, en primer lugar, de la *Estrategia de la UE para las vacunas contra la COVID-19* publicada por la Comisión Europea en 17 de junio de 2020 (Comisión Europea 2020b) que instituía la posibilidad de disponer vacunas para hacer frente al SARS-CoV-2 en la UE mediante una respuesta conjunta (algunos estados como Alemania, Francia, Italia o los Países Bajos ya habían formado una alianza inclusiva para el desarrollo de una vacuna). Las ventajas de gestionar un proceso central de contratación permitían a todos los Estados miembros de la UE beneficiarse de una opción de compra de vacunas mediante una única acción de contratación pública y centralizada reduciendo los costes.

Se trataba de un mecanismo que permitía ganar en rapidez y eficiencia, frente a las actuaciones individuales de los Estados miembros. La Comisión señala: «Un enfoque verdaderamente europeo evita la competencia entre Estados miembros y favorece la solidaridad entre ellos, independientemente del tamaño de su población y de su poder adquisitivo. Un enfoque a nivel de toda la UE mejorará la posición negociadora de la UE con la industria. También nos permitirá combinar los conocimientos científicos y normativos de la Comisión y de los Estados miembros».

Por otra parte, muchas de las actuaciones que debía hacer la HERA ya estaban previstas o realizándose con anterioridad. En el denominado *Plan de preparación en materia de biodefensa «Incubadora HERA»*. En febrero de 2021, la Comisión Europea publica la Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo Europeo y al Consejo. *Incubadora HERA. Anticipar juntos la amenaza de las variantes del virus de la COVID-19* (Comisión Europea 2021a).

En esta Comunicación, la Comisión Europea pretende recoger las lecciones aprendidas sobre retrasos, interrupciones y cuellos de botella. El plan de preparación en materia de biodefensa, denominado Incubadora

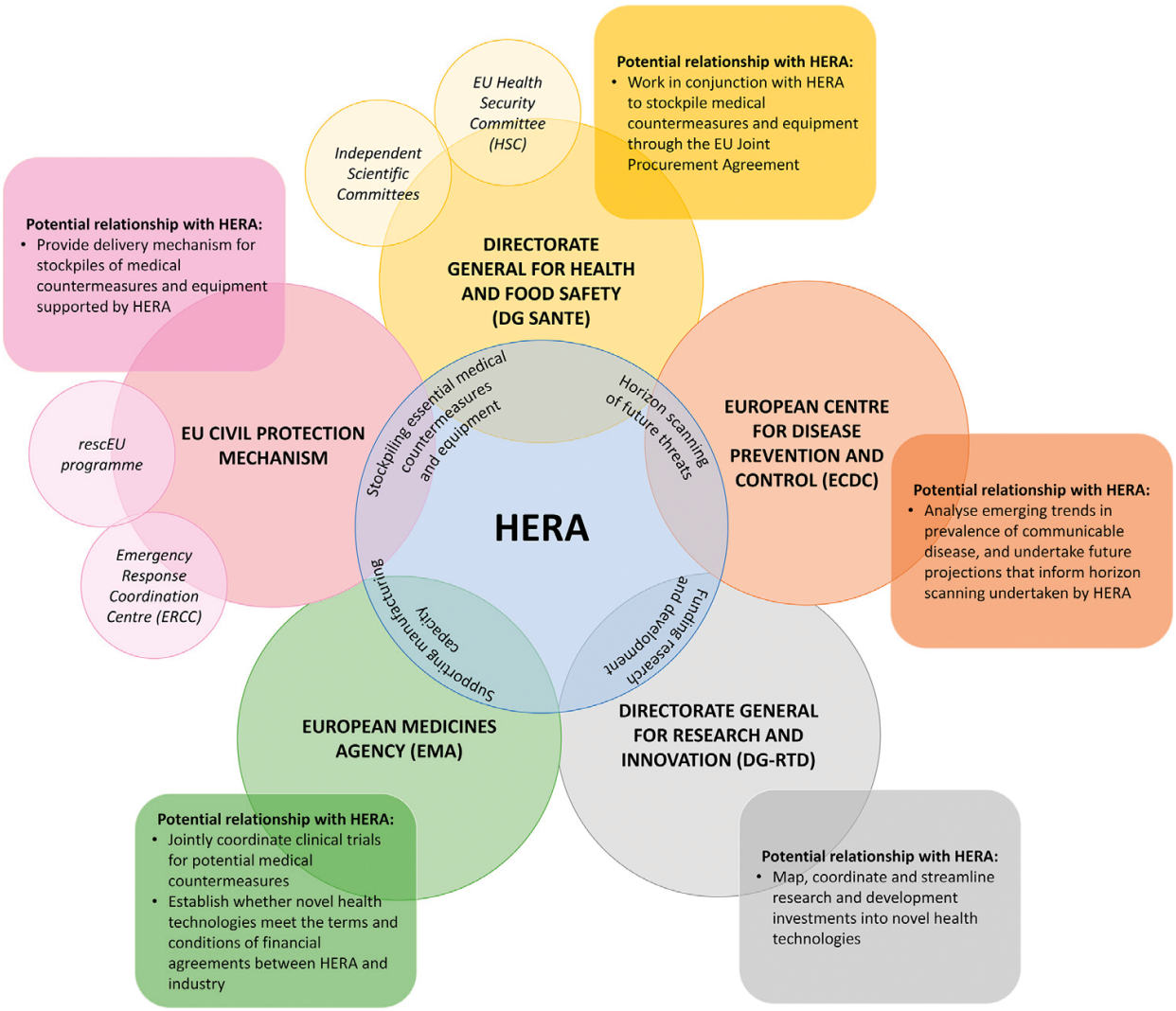


Figura 4. El papel de HERA en la coordinación de las respuestas europeas a las principales amenazas para la salud. M. Anderson *et al.*, *The Lancet Regional Health-Europe 9* (2021) (Anderson *et al.* 2021)

HERA, está diseñado para movilizar todos los recursos necesarios para prevenir, reducir y responder al posible impacto potencial de la pandemia, centrando en 5 frentes: 1) la detección rápida de variantes; 2) la adaptación rápida de las vacunas; 3) el establecimiento de una red europea de ensayos clínicos; 4) la tramitación acelerada de la aprobación reglamentaria de vacunas actualizadas e infraestructura de producción nueva o reorientada; así como 5) el impulso del aumento de la escala de la producción de vacunas contra la COVID19 existentes, adaptadas o nuevas.

Esta comunicación fue la antesala de la creación del HERA. La Comisión Europea lo señalaba expresamente en su introducción: «Este plan de emergencia hará frente a la amenaza a corto y medio plazo, al tiempo que nos prepara para el futuro. Será la vanguardia de la Autoridad Europea de Preparación y Respuesta ante Emergencias Sanitarias (HERA)».

Finalmente, el 29 de septiembre de 2021, se publica en el DOUE la Decisión de la Comisión de 16 de septiembre de 2021 por la que se crea la Autoridad de Preparación y Respuesta ante Emergencias Sanitarias (Comisión Europea 2021b). En el preámbulo de la Decisión se señala que hasta el momento los contactos y la cooperación entre las autoridades reguladoras de los Estados miembros, las otras autoridades públicas y la industria, así como entre los agentes de la industria que intervienen en la cadena de suministro se habían realizado satisfactoriamente. Y se indica también que se ha velado por la seguridad del suministro de medicamentos con el continuado intercambio de información sobre el funcionamiento de las cadenas de valor de los productos farmacéuticos, mediante un diálogo estructurado con la Industria y demás partes implicadas, con todo, parece necesario dar un paso más. Así se señala en el considerando 6:

> Sin embargo, la tarea de garantizar el suministro y el acceso en el ámbito de las contramedidas médicas, como las vacunas, los medicamentos, los equipos médicos y los diagnósticos, ha estado hasta ahora fragmentada entre diferentes marcos políticos y programas de financiación de la Unión. La necesidad de aumentar la eficacia de la preparación y la respuesta ante emergencias sanitarias requiere la creación de una estructura central específica, a saber, la HERA, como un servicio de la Comisión, que se complemente y cree sinergias con las estructuras y mecanismos existentes de la Unión, incluido el sistema de preparación y gestión de crisis de la Unión (AEPD 2021).

Uno de los principales interrogantes de futuro respecto a la HERA es saber las materias en las que se centrará su actividad. Naturalmente, los equilibrios entre actuaciones centralizadas en esta Autoridad o descentralizadas en autoridades de cada Estado miembro dependerán de las decisiones que se propongan por el Comité de Coordinación y sean respaldadas por el Consejo de la HERA. En todo caso, la Comisión ha previsto, a más tardar en 2025, un examen exhaustivo de la ejecución de las operaciones de la HERA. El reexamen abordará, en particular, cualquier necesidad de modificar el mandato de la HERA y las implicaciones financieras de tal modificación, especialmente considerando los diferentes agentes que tiene relación con HERA (fig. 4).

3.2. El refuerzo del papel de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)

Otro de los aspectos fundamentales en el ámbito de los medicamentos (y de los productos sanitarios) durante la pandemia fue dedicar importantes recursos humanos y presupuestarios a los retos del momento.

La evaluación de nuevos medicamentos potencialmente útiles en COVID-19 debía hacerse con una extraordinaria rapidez por parte de las autoridades competentes, especialmente porque decenas de miles de científicos y centenares de organizaciones estaban generando información que permitiría disponer de propuestas para nuevos tratamientos, reposicionar los existentes y aprobar vacunas COVID-19. Por tanto, los responsables de la evaluación y del control de medicamentos no podían quedarse al margen de este ímpetu que movía a los profesionales. De hecho, no escatimaron esfuerzos para acelerar el proceso de autorización, control y modificación de las condiciones de autorización de medicamentos.

Esta «épica» que imperó en la presentación de la documentación por parte de la Industria Farmacéutica y sobre todo en su evaluación por las autoridades competentes conforme se disponía de la documentación, el conocido como *rolling review*, es otra de las actuaciones excepcionales que la pandemia puede consolidar como regla para el futuro (fig. 5).

No debemos olvidar que la evaluación de los medicamentos en la UE se realiza por evaluadores de las agencias nacionales, en colaboración con el personal de la EMA. Por tanto, los expertos de las agencias nacionales y los de la EMA se vieron necesitados de coordinarse y de favorecer la tramitación de las solicitudes todos los días de la semana y prácticamente a cualquier hora.

Esta situación, obligada por la pandemia, necesitaba una ordenación normativa. La EMA no fue creada para hacer frente a estas situaciones y por tanto, de nuevo aprendiendo de la experiencia vivida, se adoptó el Reglamento (UE) 2022/123 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de enero de 2022 relativo al papel reforzado de la Agencia Europea de Medicamentos en la preparación y gestión de crisis con respecto a los medicamentos y los productos sanitarios (Unión Europea 2022).

El reglamento persigue velar por un alto nivel de protección de la salud humana asegurando para ello el buen funcionamiento del mercado interior en lo que respecta a los medicamentos y los productos sanitarios.

Los productos sanitarios se incorporan de esta manera a la tutela de la EMA. La justificación la encontramos en el preámbulo del Reglamento que indica que la rápida evolución de la COVID-19 y la propagación del virus provocaron un fuerte aumento de la demanda de productos sanitarios, como respiradores, mascarillas quirúrgicas y kits de test de diagnóstico de COVID-19, al mismo tiempo que la interrupción de la producción o la capacidad limitada para aumentarla rápidamente, junto con la complejidad y la naturaleza mundial de la cadena de suministro de productos sanitarios provocaron grandes dificultades de abastecimiento y, en algunos momentos, una grave escasez de productos sanitarios.

También recoge el preámbulo una cierta crítica a la actuación de los Estados miembros por competencia entre ellos para responder a las necesidades legítimas de sus ciudadanos, generaban acaparamiento y almacenamiento nacionales. Señala, además, la proliferación de nuevas entidades en la fabricación acelerada de esos productos sanitarios, lo que a su vez provocó retrasos a la hora de evaluar la conformidad y la prevalencia de productos sanitarios con un coste excesivo, no conformes, no seguros y, en algunos casos, falsificados.

En definitiva, se incluye un capítulo en el Reglamento para garantizar un seguimiento más sólido y eficaz de toda escasez de productos sanitarios que pueda acontecer durante una emergencia de salud pública y la coordinación de la gestión de dicha escasez, así como un diálogo temprano y reforzado con el sector industrial de los productos sanitarios y con los profesionales sanitarios a fin de prevenir y mitigar esa escasez.

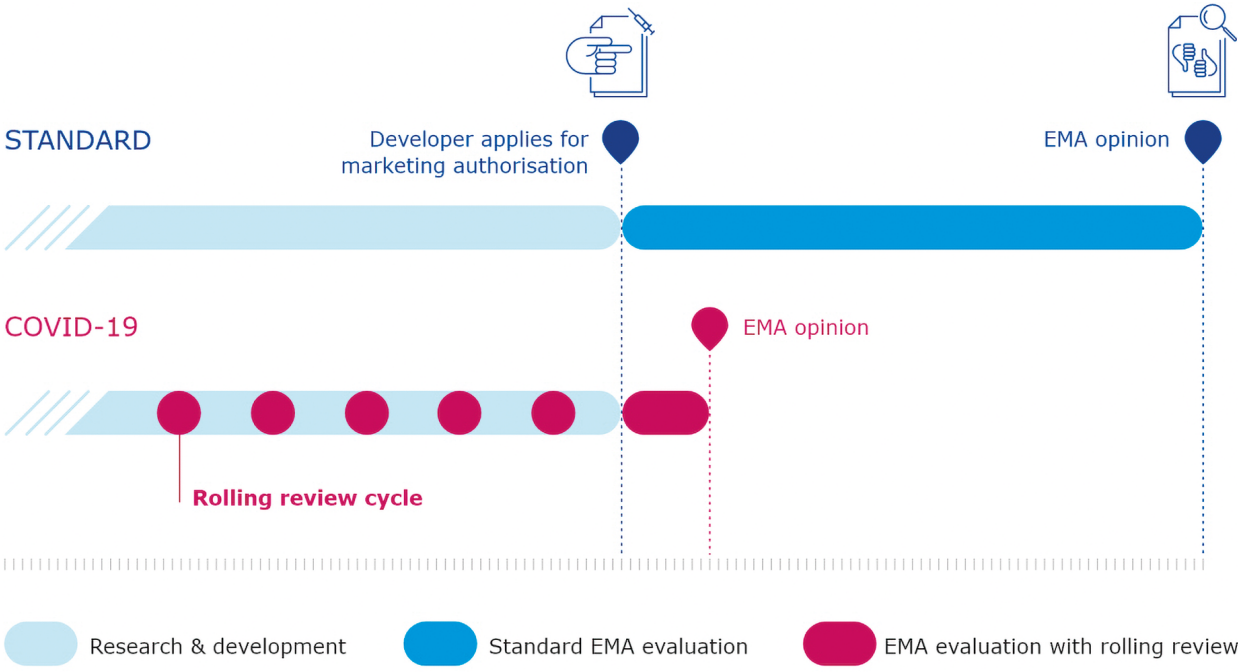


Figura 5. Comparación entre el procedimiento estándar y el «Rolling review» en la EMA en el que la evaluación se realiza antes de la solicitud formal del dossier de registro. Fuente: EMA (n.d.)

Junto al primer objetivo de garantizar el buen funcionamiento del mercado interior en lo que respecta a los medicamentos y los productos sanitarios, el segundo gran objetivo del Reglamento es garantizar la calidad, la seguridad y la eficacia de los medicamentos con potencial para responder a emergencias de salud pública.

El Reglamento dedica un capítulo al seguimiento y la mitigación de la escasez de medicamentos esenciales y gestión de acontecimientos graves cuya definición a los efectos del Reglamento (art. 2 b) es la siguiente:

> b) «acontecimiento grave»: un acontecimiento que pueda plantear un riesgo importante para la salud pública en relación con los medicamentos en más de un Estado miembro, acontecimiento que se refiere a una amenaza mortal o, en todo caso, grave para la salud y de origen biológico, químico, medioambiental u otro, o a un incidente grave que pueda afectar a la oferta o la demanda de medicamentos, o a la calidad, la seguridad y la eficacia de medicamentos, y tal acontecimiento pueda dar lugar a escasez de medicamentos en más de un Estado miembro y requiera una coordinación urgente a escala de la Unión para garantizar un alto nivel de protección de la salud humana;

Esta amplia definición abre algunas incógnitas, especialmente a lo tocante a la magnitud de la escasez cuando ocurra en más de un Estado miembro. Es plausible que el grado de intervención por la EMA dependa de las circunstancias del desabastecimiento, y de la posición de los Estados miembros afectados.

Por otra parte, el seguimiento que se realiza sobre estos medicamentos determina que el Titular de la autorización de comercialización establezca un punto de contacto único para la UE. También se prevé en la norma la creación de una plataforma informática para procesar información de la oferta y la demanda de medicamentos esenciales durante emergencias de salud pública o acontecimientos graves y, al margen de esas situaciones, para poder informar sobre la escasez de medicamentos que pueda dar lugar a emergencias de salud pública o acontecimientos graves.

Asimismo, el Reglamento establece el refuerzo de la EMA con un Grupo Director Ejecutivo sobre Escasez y Seguridad de los Medicamentos que, entre otros cometidos, elaboren listas respectivamente de medicamentos esenciales para asegurar el seguimiento de estos.

Con esta base jurídica se ha adoptado una lista de medicamentos autorizados considerados críticos para la gestión y prevención de la COVID-19. La oferta y demanda de estos medicamentos tendrá una especial monitorización (figs. 6 y 7).

Otro de los capítulos del Reglamento se dedica a los medicamentos con potencial para hacer frente a emergencias de salud pública, reforzando igualmente a la EMA con la creación de un Grupo de Trabajo sobre Emergencias que, entre otros cometidos, proporcionará asesoramiento científico y revisará los datos científicos disponibles sobre medicamentos con potencial para hacer frente a la emergencia de salud pública, asesorará a los desarrolladores de

Table 1. List of critical medicines for COVID-19 public health emergency - authorised COVID-19 vaccines

Product name	International non-proprietary name (INN) or common name	Active substance	Pharmaceutical form(s)	Route of administration	Strengths
Comirnaty	Tozinameran/ COVID-19 mRNA Vaccine (nucleoside modified)	Single-stranded, 5'-capped messenger RNA produced using a cell-free *in vitro* transcription from the corresponding DNA templates, encoding the viral spike (S) protein of SARS-CoV-2	Concentrate for dispersion for injection; Dispersion for injection	Parenteral	All
Jcovden (previously COVID-19 Vaccine Janssen)	COVID-19 vaccine (Ad26.COV2-S [recombinant])	Adenovirus type 26 encoding the SARS-CoV-2 spike glycoprotein (Ad26.COV2-S)	Suspension for injection	Parenteral	All
Nuvaxovid	COVID-19 Vaccine (recombinant, adjuvanted)	SARS-CoV-2 recombinant spike protein	Dispersion for injection	Parenteral	All
Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna)	elasomeran/ COVID-19 mRNA vaccine (nucleoside-modified)	CX-024414 (single-stranded, 5'-capped messenger RNA (mRNA) produced using a cell-free *in vitro* transcription from the corresponding DNA templates, encoding the viral spike (S) protein of SARS-CoV-2)	Dispersion for injection	Parenteral	All
Vaxzevria (previously COVID-19 Vaccine AstraZeneca)	COVID-19 Vaccine (ChAdOx1-S [recombinant])	ChAdOx1-SARS-COV-2	Suspension for injection	Parenteral	All

Figura 6. Lista de medicamentos críticos para COVID-19. Vacunas autorizadas. Fuente: EMA (2022)

Table 2. List of critical medicines for COVID-19 public health emergency - authorised COVID-19 therapeutics

Product name	International non-proprietary name (INN) or common name	Active substance(s)	Pharmaceutical form(s)	Route of administration	Strengths
Dexamethasone-containing medicines[1,2]	Dexamethasone	Dexamethasone	Tablet; Oral solution; Solution for injection; Solution for injection/infusion	Oral, Parenteral	All
Evusheld	Tixagevimab/Cilgavimab	Tixagevimab/Cilgavimab	Solution for injection	Parenteral	All
Kineret	Anakinra	Anakinra	Solution for injection	Parenteral	All
Paxlovid	PF-07321332/Ritonavir	PF-07321332[3]/ Ritonavir	Film-coated tablet	Oral	All
Regkirona	Regdanvimab	Regdanvimab	Concentrate for solution for infusion	Parenteral	All
RoActemra	Tocilizumab	Tocilizumab	Solution for injection; Concentrate for solution for infusion	Parenteral	All
Ronapreve	Casirivimab/Imdevimab	Casirivimab/Imdevimab	Solution for injection/infusion	Parenteral	All
Veklury	Remdesivir	Remdesivir	Powder for concentrate for solution for infusion	Parenteral	All
Xevudy	Sotrovimab	Sotrovimab	Concentrate for solution for infusion	Parenteral	All

Figura 7. Lista de medicamentos críticos para COVID-19. Medicamentos autorizados. Fuente: EMA (2022)

ensayos clínicos destinados a tratar, prevenir o diagnosticar la enfermedad causante de la emergencia de salud pública y, en definitiva, colaborará y contribuirá con los comités científicos y los diferentes grupos de la EMA, así como con las autoridades, formulando recomendaciones científicas sobre el uso de cualquier medicamento con potencial para hacer frente a emergencias de salud pública.

Se trata, en definitiva, de regular que la EMA disponga de unas estructuras mejoradas que garanticen una gestión adecuada de las emergencias de salud pública y de los acontecimientos graves, y que coordinen y proporcionen asesoramiento en materia de investigación y desarrollo relativos a medicamentos con potencial para mitigar emergencias de salud pública o acontecimientos graves.

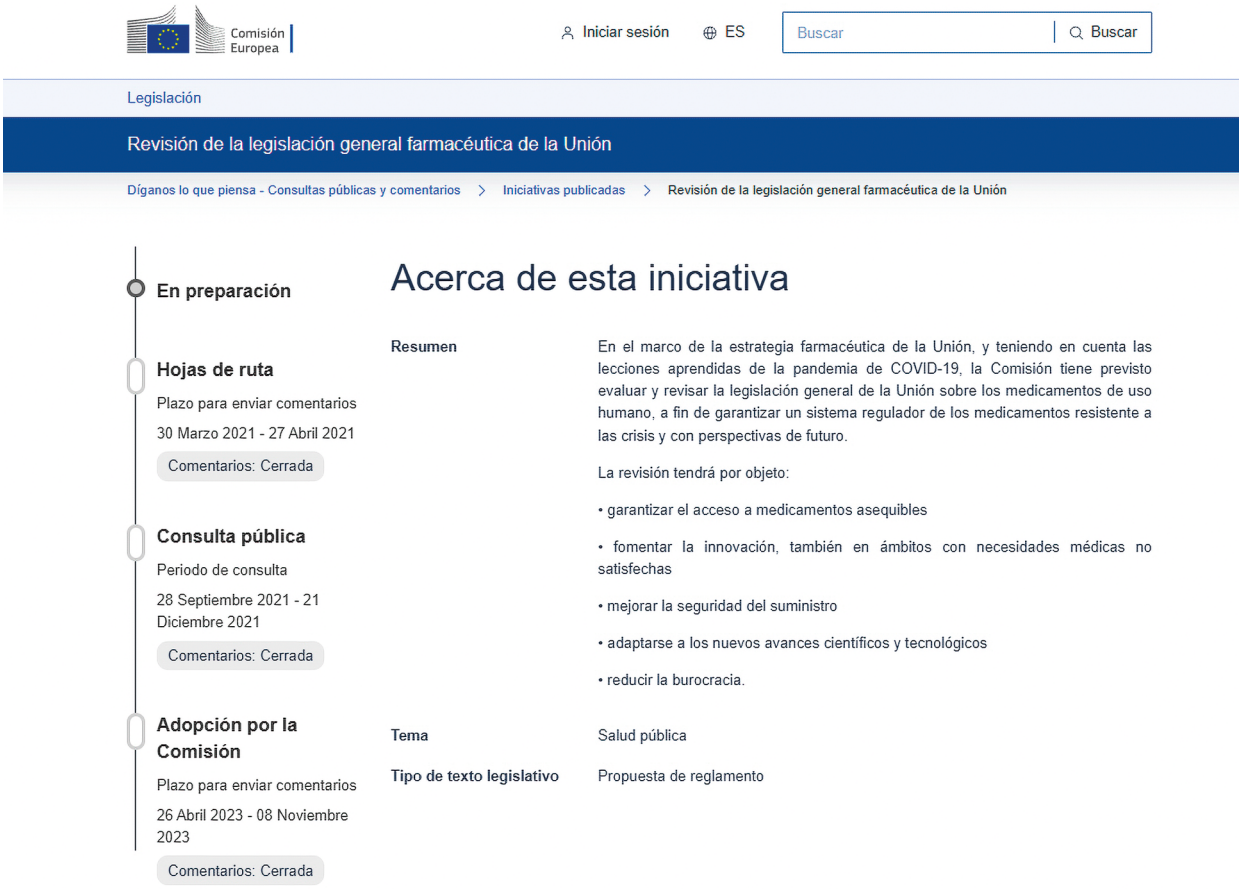


Figura 8. Pasos adoptados por la Comisión Europea para la revisión de la legislación general farmacéutica de la Unión. Fuente: Comisión Europea (2021c)

3.3. La futura legislación europea sobre el medicamento. La Estrategia Farmacéutica Europea

Para terminar este repaso, se debe citar la Revisión de la legislación general farmacéutica de la Unión reforma general de la legislación europea anunciado por la Comisión (fig. 8).

Esta reforma general seguirá a la que tuvo lugar en 2001 con la codificación de buena parte de la legislación farmacéutica. La reforma fue anunciada por la Comisión Europea, el 25 de noviembre de 2020 bajo el título «Estrategia Farmacéutica para Europa» (Comisión Europea 2021a).

En la Estrategia se indica: «Se precisa un nuevo enfoque en el ámbito de la UE para garantizar que dispongamos de una industria sólida, competitiva y ecológica que satisfaga las necesidades de los pacientes y que aproveche el potencial de la transformación digital del ámbito sanitario y asistencial, impulsada por los avances tecnológicos en campos como la inteligencia artificial y la modelización computacional».

La reforma, en sí misma, no surge por la pandemia, pero las repercusiones de esta crisis sí han condicionado una parte de la estrategia porque se ha puesto al descubierto las vulnerabilidades relacionadas con la disponibilidad de datos, el suministro de medicamentos o la disponibilidad de capacidades de fabricación para adaptar y apoyar la producción de medicamentos.

Según el criterio de la Comisión señalado en la Estrategia: «la pandemia ha demostrado que se necesitan enfoques innovadores para el desarrollo, la aprobación y el seguimiento posterior a la autorización de las vacunas, así como nuevas indicaciones para los medicamentos».

Entre estos enfoques innovadores estaría la transformación digital, que deberá irrumpir en los próximos años en el ámbito sanitario de la UE para el acceso seguro y abierto de datos sanitarios de todo tipo, desde información para el seguimiento de las nuevas vacunas (complementario a la farmacovigilancia), hasta los datos de la vida real para mejorar la eficacia y seguridad de los medicamentos, o bases de datos de moléculas que tienen las compañías farmacéuticas para reposicionamiento de medicamentos.

La apuesta por la digitalización parece muy clara en la Estrategia: «La transformación digital tiene efectos en el descubrimiento, el desarrollo, la fabricación, la generación de pruebas, la evaluación, el suministro y el uso de

los medicamentos. Los medicamentos, tecnologías médicas y la salud digital se están convirtiendo cada vez más en parte integral de las opciones terapéuticas dominantes. Estas incluyen sistemas basados en la inteligencia artificial para la prevención, diagnóstico, mejor tratamiento, seguimiento terapéutico y datos para medicamentos personalizados y otras aplicaciones de asistencia sanitaria».

Además, se pretende que la tecnología digital y la inteligencia artificial puedan apoyar la toma de decisiones en los procesos regulatorios que deben aumentar en eficiencia. La experiencia de la EMA durante la pandemia de COVID-19 (p. ej. en la revisión continua de los nuevos datos científicos para acelerar la evaluación) determinará sin duda las acciones futuras.

Otro de los grandes objetivos de la Estrategia está en plena sintonía con lo acordado por el Consejo Europeo para contrarrestar los efectos de la pandemia y promover una recuperación sólida de Europa sobre la base de la transición ecológica y la transformación digital, teniendo como objetivo clave de la Unión alcanzar «una autonomía estratégica al tiempo que se mantiene una economía abierta» (Consejo Europeo 2020).

La pandemia ha puesto en evidencia que los problemas relacionados con el suministro de medicamentos que habitualmente se producen en los mercados europeos se pueden ver exacerbados en una situación de crisis sanitaria. La pandemia ha puesto sobre la mesa la necesidad de tener una cierta autonomía estratégica en la UE en el ámbito de los medicamentos. Para ello es fundamental «identificar las dependencias estratégicas en materia de salud y proponer medidas para reducirlas, incluso mediante la diversificación de las cadenas de producción y suministro, asegurando el almacenamiento estratégico y fomentando la producción y la inversión en Europa».

De nuevo, el diálogo entre las partes, diálogo estructurado (Comisión Europea 2021d) como se ha venido en denominar estas actuaciones, es la respuesta que se pretende dar al problema del suministro en la Unión. En una primera etapa de estos trabajos es necesario comprender mejor el funcionamiento de las cadenas de suministro mundiales y las vulnerabilidades potenciales y dependencias que amenazan el suministro de medicamentos críticos, principios activos farmacéuticos y materias primas. Una vez analizada la cuestión, se propondrán las medidas orientadas a minimizar estos problemas.

La reforma de la legislación general farmacéutica de la Unión cierra el plazo para enviar comentarios el 8 de noviembre de 2023. Teniendo en cuenta que en el primer semestre del 2024 habrá una renovación del Parlamento Europeo y de la Comisión, en estos momentos hay bastantes incógnitas por resolver para ver el camino que tomará esta iniciativa. En todo caso, la UE viene perdiendo competitividad respecto a otros mercados mundiales y es precisamente la regulación la mejor opción y una oportunidad para animar a la industria farmacéutica internacional a destinar más recursos en I+D y producción de nuevos medicamentos en la UE.

CONCLUSIONES

El negativo y doloroso impacto mundial que ha tenido la pandemia de COVID-19 en vidas humanas y en las economías de los países, ha transformado algunas actuaciones que, si bien se han aplicado con carácter excepcional y transitorio para hacer frente a las consecuencias de la pandemia, pueden consolidarse en el futuro. En el ámbito del medicamento, debido a su estricta regulación, estas actuaciones excepcionales deben suponer cambios legislativos relevantes.

Las principales actuaciones en respuesta a la pandemia en el ámbito de los medicamentos se han producido principalmente en la investigación clínica, tanto para iniciar ensayos clínicos para COVID-19 como para continuar con las adecuadas garantías los ensayos clínicos en curso para el resto de patologías; y en la fabricación y distribución de medicamentos, con la necesidad de identificar y hacer un seguimiento de determinados medicamentos críticos desde un punto de vista sanitario y vulnerables desde un punto de vista de suministro.

La pandemia puede entenderse como un punto de inflexión que supondrá un cambio en la regulación farmacéutica que deberá estar orientada a buscar una mayor eficiencia en los procesos, una mejor coordinación entre agentes y una mayor capacidad de respuesta de la UE y de los Estados miembros ante futuras amenazas.

BIBLIOGRAFÍA

AEMPS (2021a), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Documento de instrucciones de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios para la realización de ensayos clínicos en España. Versión 16, de 31 de enero de 2021. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/medicamentos/docs/Instrucciones-realizacion-ensayos-clinicos.pdf?x46962

AEMPS (2022), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Medicamentos estratégicos. Medicamentos Estratégicos. 2022. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/medicamentos-estrategicos/

AEMPS (2020), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Memoria 2020. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/laAEMPS/2021/docs/memoria-2020.pdf?x25508

AEMPS (2021b), Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Memoria 2021. Disponible en https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/laAEMPS/2021/docs/memoria-2021.pdf?x55250

AEPD (2021), Agencia Española de Protección de Datos. Memoria 2021. https://www.aepd.es/es/documento/memoria-aepd-2021.pdf

AEPD (2020), Agencia Española de Protección de Datos. Respuesta a la consulta sobre acceso remoto con verificación de datos fuente por parte de los monitores de los ensayos clínicos. 27.05.2020. Disponible en: https://www.aepd.es/sites/default/files/2020-06/Monitorizacion-remota-Verificacion-Datos-Fuente.pdf

ANDERSON, M., FORMAN, R. & MOSSIALOS, E. (2021), Navigating the Role of the European Union (EU) Health Emergency Preparedness and Response Authority (HERA) in Europe and Beyond. 2021. The Lancet Regional Health. DOI: https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100203

COCA, M.T. (2020), El Economista.es, La pandemia ha demostrado lo importante que es tener la industria farmacéutica en el territorio. 14/10/2020. Disponible en: https://www.eleconomista.es/catalunya/noticias/10826446/10/20/Ignasi-Biosca-Reig-Jofre-La-pandemia-ha-demostrado-lo-importante-que-es-tener-la-industria-farmaceutica-en-el-territorio.html

COMISIÓN EUROPEA (2020a), Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones Construir una Unión Europea de la Salud: reforzar la resiliencia de la UE ante las amenazas transfronterizas para la salud. 2020. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=-COM:2020:724:FIN

COMISIÓN EUROPEA (2020b), Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo Europeo y al Banco Europeo de Inversiones. Estrategia de la UE para las vacunas contra la COVID-19. 2020. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52020DC0245&from=EN

COMISIÓN EUROPEA (2020c), Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. Estrategia farmacéutica para Europa. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:52020DC0761

COMISIÓN EUROPEA (2021a), Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo Europeo y al Consejo Incubadora HERA. Anticipar juntos la amenaza de las variantes del virus de la COVID-19. 2021. Disponible en: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52021DC0078&from=FR

COMISIÓN EUROPEA (2021b), Decisión de la Comisión de 16 de septiembre de 2021 por la que se crea la Autoridad de Preparación y Respuesta ante Emergencias Sanitarias. «DOUE» núm. 393, de 29 de septiembre de 2021. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-Y-2021-70065

COMISIÓN EUROPEA (2020d), Discurso sobre el estado de la Unión 2020. Disponible en: https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/state_of_the_union_es.pdf

COMISIÓN EUROPEA (2022a), Guidance on the Management of Clinical Trials during the COVID-19 (Coronavirus) Pandemic Version 5 10/02/2022. Disponible en: https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-02/guidanceclinicaltrials_covid19_en_1.pdf

COMISIÓN EUROPEA (2021c), Revisión de la legislación general farmacéutica de la Unión. Disponible en: https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/12963-Revision-de-la-legislacion-general-farmaceutica-de-la-Union_es

COMISIÓN EUROPEA (2021d), Structured Dialogue on Security of Medicines Supply. Disponible en: https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/pharmaceutical-strategy-europe/structured-dialogue-security-medicines-supply_en

COMISIÓN EUROPEA (2022b), HMA, EMA. ACT EU Multi-Annual Working Plan 2022-2026. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/act-eu-multi-annual-workplan-2022-2026_en.pdf

COMISIÓN EUROPEA (2021d), UNIÓN EUROPEA DE LA SALUD: hacia una reforma de la legislación farmacéutica de la UE. Disponible en: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/es/ip_21_4882

CONSEJO EUROPEO (2020), Reunión extraordinaria del Consejo Europeo (1 y 2 de octubre de 2020) – Conclusiones. Disponible en: https://www.consilium.europa.eu/media/45932/021020-euco-final-conclusions-es.pdf

EMA (n.d.), COVID-19 Vaccines: Development, Evaluation, Approval and Monitoring. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-development-evaluation-approval-monitoring.

EMA (2022), European Medicines Agency. List of Critical Medicines for COVID-19 Public Health Emergency (PHE) Under Regulation (EU) 2022/123. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/list-critical-medicines-covid-19-public-health-emergency-phe-under-regulation-eu-2022/123_en.pdf

FARMAINDUSTRIA (2021), Notas de prensa. El plan de Farmaindustria para impulsar la producción de medicamentos esenciales generará 1.700 millones de euros de

inversión. 2021. Disponible en: https://www.farmaindustria.es/web/prensa/notas-de-prensa/2021/06/17/el-plan-de-farmaindustria-para-impulsar-la-produccion-de-medicamentos-esenciales-generara-1-700-millones-de-euros-de-inversion/

FARMAINDUSTRIA (2020), UIMP discurso Martín Sellés. Disponible en: https://www.farmaindustria.es/web/prensa/notas-de-prensa/2020/09/03/la-industria-farmaceutica-clave-contra-la-pandemia-y-para-la-reactivacion-economica-y-social-de-espana/

GOBIERNO DE ESPAÑA (2021a), Memoria Explicativa PERTE para la Salud de Vanguardia. Disponible en: https://www.lamoncloa.gob.es/presidente/actividades/Documents/2021/151121_PERTE-Memoria-explicativa.pdf

GOBIERNO DE ESPAÑA (2021b), Plan de Recuperación Transformación y Resiliencia. Componente 18 Renovación y ampliación de capacidades del Sistema Nacional de Salud. Disponible en: https://www.lamoncloa.gob.es/temas/fondos-recuperacion/Documents/16062021-Componente18.pdf

LEY 2/2021, de 29 de marzo, de medidas urgentes de prevención, contención y coordinación para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2021-4908

LEY ORGÁNICA 4/1981, de 1 de junio, de los estados de alarma, excepción y sitio. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1981-12774

MINCOTUR (2020), Ministerio de Industria, Comercio y Turismo. Anuncio público de presentación de Manifestaciones de Interés (MDI) que aspiran a realizar proyectos dentro del Programa de Impulso de proyectos tractores de Competitividad y Sostenibilidad Industrial. 2020. Disponible en: https://industria.gob.es/es-es/participacion_publica/Paginas/DetallesParticipacionPublica.aspx?k=362

MINCOTUR (2022), Ministerio de Industria, Comercio y Turismo. Ayudas a proyectos estratégicos para la transición industrial del sector farmacéutico y del sector productos sanitarios (PERTE SALUD de VANGUARDIA) Normativa: Convocatoria 2022. Disponible en: https://www.mincotur.gob.es/PortalAyudas/IDI-Farma/Normativa/Paginas/Convocatoria-202.aspx

MINCOTUR (2021), Ministerio de Industria, Comercio y Turismo. PROFARMA (2021-2022): Fomento de la competitividad en la Industria Farmacéutica. Disponible en: https://www.mincotur.gob.es/portalayudas/profarma/Paginas/index.aspx

ORDEN DE 06 DE MAYO DE 2022, Extracto de la Orden de 06 de mayo de 2022, por la que se efectúa la convocatoria de ayudas a proyectos estratégicos para la transición industrial del sector farmacéutico y del sector de productos sanitarios, bajo el PERTE SALUD de VANGUARDIA, en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia en el año 2022 Publicado en: «BOE» núm. 109, de 7 de mayo de 2022, páginas 21903 a 21904 (2 págs.) Disponible en: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-B-2022-14280

ORDEN SND/293/2020, de 25 de marzo, por la que se establecen condiciones a la dispensación y administración de medicamentos en el ámbito del Sistema Nacional de Salud, ante la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. Publicado en: «BOE» núm. 85, de 27/03/2020. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2020-4130#:~:text=Ayuda-,Orden%20SND%2F293%2F2020%2C%20de%2025%20de%20marzo%2C,de%2027%2F03%2F2020.

REAL DECRETO 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2020-3692

REAL DECRETO LEGISLATIVO 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2015-8343&b=12&tn=1&p=20230629#a3

REGLAMENTO (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la Directiva 95/46/CE (RGPD). Disponible en: https://www.boe.es/doue/2016/119/L00001-00088.pdf

RESOLUCIÓN DE 17 DE MAYO DE 2022, de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, por la que se modifica la de 19 de junio de 2020, por la que se establece el listado de los medicamentos considerados esenciales en la gestión de la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19, en virtud de lo dispuesto en el artículo 19.1 del Real Decreto-ley 21/2020, de 9 de junio, de medidas urgentes de prevención, contención y coordinación para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. Publicado en: «BOE» núm. 139, de 11 de junio de 2022. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2022-9608

RESOLUCIÓN DE 19 DE JUNIO DE 2020, de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, por la que se establece el listado de los medicamentos considerados esenciales en la gestión de la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19, en virtud de lo dispuesto en el artículo 19.1 del Real Decreto-ley 21/2020, de

9 de junio, de medidas urgentes de prevención, contención y coordinación para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19.Publicado en: «BOE» núm. 172, de 20/06/2020. Disponible en: https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2020-6474

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (2022a), El SAS continúa reforzando el envío a domicilio de medicamentos de dispensación hospitalaria. Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/organismos/saludyconsumo/servicios/actualidad/noticias/detalle/275834.html

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (2022b), El SAS continúa reforzando el envío a domicilio de medicamentos de dispensación hospitalaria. Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/organismos/saludyconsumo/servicios/actualidad/noticias/detalle/278607.html

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (2021a), El SAS enviará a domicilio medicamentos de dispensación hospitalaria. Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/organismos/saludyconsumo/servicios/actualidad/noticias/detalle/254880.html

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (2021b), El SAS refuerza el envío a domicilio de medicamentos de dispensación hospitalaria. Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/organismos/saludyconsumo/servicios/actualidad/noticias/detalle/271749.html

UNIÓN EUROPEA. Reglamento (UE) 2022/123 Del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de enero de 2022 relativo al papel reforzado de la Agencia Europea de Medicamentos en la preparación y gestión de crisis con respecto a los medicamentos y los productos sanitarios. DOUE L 20/1. Disponible en https://www.boe.es/doue/2022/020/L00001-00037.pdf

Capítulo XXX
Era post COVID-19

José Manuel Cárdenas Gutiérrez[1], Guillermo Sequera[2], José del Carmen Aliaga Arauco[3] y Alejandra Fernández-Jiménez[4]

[1] *Académico Correspondiente Institucional de la Real Academia Nacional de Farmacia, Expresidente de la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas de México, Presidente y Director General de Investigación, Ciencia y Tecnología Internacional SA de CV, Ciudad de México (México)*

[2] *Academia Nacional de Farmacia de Perú. Profesor Emérito Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima (Perú)*

[3] *Academia de Ciencias Farmacéuticas del Paraguay MD, MPJ, Dirección General de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Paraguay, Cátedra de Salud Pública, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Asunción (Paraguay)*

[4] *Academia Nacional de Farmacia de Costa Rica. Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica (Costa Rica)*

Este capítulo incluye aportaciones de los representantes de cuatro Academias de Farmacia Iberoamericanas pertenecientes a la Asociación Iberoamericanas de Academias de Farmacia (AIAF), a saber, Academia de Ciencias Farmacéuticas de México, Academia de Ciencias Farmacéuticas del Paraguay, Academia Nacional de Farmacia del Perú, y Academia Nacional de Farmacia de Costa Rica, interesadas todas en la era post COVID-19 y en las aportaciones que la profesión farmacéutica ha llevado a cabo durante la crisis sanitaria en los diversos ámbitos (México y Costa Rica), así como las consecuencias de la complejidad de la pandemia en Sudamérica (Paraguay) y las consecuencias en la salud y en la educación de la población (Perú). Estos asuntos se trataron con detenimiento en el marco del X Encuentro de la AIAF, celebrado en Madrid, del 5 al 8 de junio de 2023, siendo Presidente del Comité Organizador del Encuentro el Excmo. Sr. D. Agustín García Asuero, y Presidente de la AIAF y de la Real Academia Nacional de Farmacia el Excmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo.

1. APORTE DE LA PROFESIÓN FARMACÉUTICA ANTE LA CRISIS: EXPERIENCIA CON LA COVID-19 EN MÉXICO *(J.M. CARDENAS)*

Los profesionales farmacéuticos de México, y en particular la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas, por ser la institución representante de nuestro gremio ante el máximo organismo de Salud, el Consejo de Salubridad General, en la definición de políticas sanitarias y específicamente en casos de emergencia como la presentada en la pandemia de COVID-19, tuvieron una destacada aportación en apoyo a nuestras autoridades de salud y a nuestra población.

Por las características de la profesión farmacéutica en México, las principales áreas en que se pudo de manera oficial aportar recomendaciones y sugerencias fueron:

1. Salud Pública.
2. Bioquímica y Biología Molecular.
3. Farmacología y Farmacia Hospitalaria.
4. Industria Farmacéutica.

Introducción

En México la declaratoria oficial de Emergencia Sanitaria por la pandemia de COVID-19, fue realizada por el Consejo de Salubridad General, en el cual nuestra Academia representa a nuestra profesión, mediante el: *ACUERDO por el que el Consejo de Salubridad General (CSG) reconoce la epidemia de enfermedad por el virus SARS-CoV2 (COVID-19) en México, como una enfermedad grave de atención prioritaria, así como se establecen las actividades de preparación y respuesta ante dicha epidemia.* ***23 de marzo de 2020***. Dada la evolución mundial

con la que la pandemia se venía desarrollando, nuestra Academia estructuró distintos grupos de trabajo, ya que se veía venir la necesidad de tener una muy rápida respuesta para las aportaciones que nuestra profesión tendría que realizar.

1.1. Salud pública

El **24 de marzo de 2020**, presentamos ante el CSG un documento elaborado días antes, titulado: «SUGERENCIAS PARA EL CONTROL DE LA PANDEMIA COVID-19 EN MÉXICO» Este documento integraba 14 recomendaciones y sugerencias, las cuales de manera resumida enuncio a continuación:

1. **Antecedentes.** Los modelos matemáticos han permitido pronosticar, el desarrollo de las epidemias para presupuestar los requerimientos de hospitales, camas de terapia intensiva e insumos necesarios para el diagnóstico temprano y la atención médica de los pacientes graves.

   Asimismo, permiten implementar estrategias orientadas a retardar el pico del brote de casos, pero principalmente bajar la velocidad de aparición de casos de infectados (aplanando la curva), debido a la más lenta diseminación del virus, reduciendo el riesgo de colapso del sistema de salud.
2. **Caso sospechoso.** Alinear su definición a lo establecido por la OMS dada la importancia que tenía para la toma de decisiones en la fase inicial de la pandemia.

   Modelo aleatorio de grupos centinela basado fundamentalmente en criterios perfectamente definidos basados de manera prioritaria por riesgo:
   - **Personas mayores de 60 años con comorbilidades.** Diabetes, sobrepeso, hipertensión, EPOC, inmunosupresión u otras enfermedades respiratorias.
   - **Personas menores de 60 años con comorbilidades.** Diabetes, sobrepeso, hipertensión, EPOC, inmunosupresión u otras enfermedades respiratorias.
   - **Personas cuyo trabajo sea indispensable.** Preferentemente las de impacto en el control de la pandemia o que requieran una alta movilidad.
3. **Estrategias para aumentar la capacidad instalada para realizar pruebas diagnósticas.**
4. **Reforzamiento del control en las ciudades de la frontera, con un modelo aleatorio de grupos centinela basado en la intensa movilidad.** Se contemplaba que la expansión del virus vendría del norte como resultado de la situación en Estados Unidos.
5. **Control de pasajeros que arriben a nuestro país por vía aérea.** No solo se les preguntaría si presentaban síntomas, de dónde venían y se les tomará la temperatura; se propuso registrar su lugar de estancia y seleccionar, aunque sea a una muestra estadística, para que a los 10 días visitarlos en sus hogares o lugares de estancia para tomar su temperatura e identificar su condición.
6. **Adultos mayores.** Usar la red de apoyo para difundir información y orientación para su monitoreo y atención en caso necesario.
7. **Reforzar tempranamente las medidas de contención.** Estas medidas debían dirigirse a las principales fuentes de riesgo de contagio, como son. El transporte urbano en la Ciudad de México y otras ciudades de alta densidad poblacional. Para apoyar estas medidas se propuso escalonar los horarios de actividad laboral y académica para disminuir la saturación y la demanda de transporte público.
8. **Capacitar al personal de los hospitales en los protocolos de manejo de pacientes.** Ante la presión en la demanda de los servicios de salud y a fin de relajar la tensión en la relación entre el personal médico y la población.
9. **Reuniones de grupos de personas** (juntas, asambleas, conferencias, etc.). Promover que se limiten a aquellas que sean absolutamente necesarias y procurar que se puedan manejar de manera virtual con apoyo de la tecnología.
10. **Rol de los medios de difusión masivos y la participación de las asociaciones de profesionistas de la salud, así como de las universidades.** El éxito de las medidas de contención dependería de su cumplimiento, lo que implicaba recurrir a estrategias de difusión que fueran convincentes y que tuvieran la penetración requerida.
11. **Asistencia psicológica.** Contar con servicios telefónicos para atender los casos de personas que presentaran crisis de ansiedad durante el aislamiento social.
12. **Tamizaje Médico.** La demanda de atención en los servicios de salud fue sin duda un factor de alto riesgo de saturación o colapso del sistema. Servicio de tamizaje médico que pudiera recibir, evaluar clínicamente y canalizar a los pacientes a un servicio paralelo de atención de enfermedades respiratorias **NO COVID-19** de diferentes grados de severidad, que disminuyera la tensión social de demanda de atención. Esto se consideraría como una red **NO COVID-19** regionalizada de servicios hospitalarios y/o se apoyaría en el primer nivel de atención que permitiría quitar presión al control de la pandemia.
13. **Plan de recuperación económica para el momento en que se reanudarían las actividades en el país.**

1.2. Bioquímica clinica y biología molecular

Derivado de este primer documento que proactivamente nuestra Academia presentó al Consejo de Salubridad

General y por la seriedad e iniciativa identificada en nuestra institución, las autoridades de salud solicitaron a la Academia Nacional de Ciencias Farmacéuticas, coordinar un equipo de especialistas de distintas instituciones prestigiadas para desarrollar las sugerencias que en esos momentos eran necesarias en el tema de pruebas diagnósticas.

Las instituciones participantes en ese grupo fueron:

1. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.
2. CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional (IPN).
3. Escuela Superior de Medicina del IPN.
4. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
5. Fundación Mexicana para la Salud (FUNSALUD).

El **6 de abril del 2020**, se entregó el documento solicitado al Consejo de Salubridad General, titulado.

ELECCIÓN, EVALUACIÓN Y USO DE PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DE COVID-19

Las principales propuestas presentadas en este documento son las siguientes:

1. REFORZAMIENTO DEL CSG

   Fuerza de trabajo y coordinación de esfuerzos de alto nivel que incluyera a la Autoridad Regulatoria, al Sistema de Vigilancia Epidemiológica Nacional, a los responsables de la operación hospitalaria pública y privada y a la representación de las Academias Nacionales de Ciencias Farmacéuticas y de Medicina.
2. ELECCIÓN DE LAS PRUEBAS MÁS CONFIABLES

   Métodos indirectos para detectar la infección, entre los que destacan los basados en la detección de los antígenos virales, que usan reactivos (anticuerpos monoclonales) altamente específicos; así como aquellos basados en la detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG. A nivel global, el seguimiento epidemiológico de los casos de COVID-19 se realizó usando los sistemas de detección o «kits» de reactivos de detección del virus utilizando rtRT-PCR.
3. CAPACIDAD DE RESPUESTA NACIONAL

   En México, el gobierno de la República inició la preparación para combatir la COVID-19 desde principios de 2020, misma que consistió en la implementación y el desarrollo de una capacidad de diagnóstico, que en esa fecha incluyó 54 laboratorios (públicos y privados) distribuidos a lo largo y ancho del país, competentes para diagnosticar con la prueba molecular. El modelo propuesto por las autoridades se basó en la evaluación comparativa del nuevo kit de rtRT-PCR, en paralelo con el método de Berlín, ejecutado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE). Y no existía una manera expedita para monitorear la evolución de la epidemia, considerando que en las condiciones que imperaban era necesario aplicar las tecnologías basadas en la detección de antígenos y la detección de anticuerpos. Como grupo de trabajo encontramos un grave rezago en el proceso de evaluación de los «kits» de laboratorio que podrían haberse comercializado y usado en el país, lo que limitó la disponibilidad de pruebas de diagnóstico.
4. POLÍTICA DE REGULACIÓN Y CONTROL

   Por otro lado, el grupo propuso que la evaluación de los «kits» de diagnóstico que pretendían comercializarse en México se realizara de manera sistemática, en paralelo a la validación de la confiabilidad de sus sistemas de detección.
5. ESTRATEGIA DE DIAGNÓSTICO, AISLAMIENTO Y ATENCIÓN MÉDICA

   Es claro que en ese momento el abasto de «kits» de diagnóstico no era suficiente para cubrir las necesidades. Se requería una política de aplicación y uso con base en prioridades. Finalmente, este grupo de trabajo brindó el apoyo y la asesoría requeridos por el CSG en esta tarea, buscando siempre las sinergias necesarias para ampliar la capacidad de respuesta.

1.3. Resultados en el transcurso de la pandemia

1. EVALUACIÓN DE NUEVOS KITS DE REACTIVOS PARA PCR. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). SSa.
2. EVALUACIÓN DE KITS DE ANTICUERPOS. INDRE. SSa.
3. EVALUACIÓN DE KITS DE ANTÍGENOS. Instituto Nacional de Nutrición y TECHSALUD del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

Se iniciaron, además, los trabajos para elaborar una: GUÍA DE USO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE LA COVID-19. Pruebas diagnósticas para COVID-19: Cuáles, ¿cuándo y, para qué, se recomienda utilizarlas? Sin embargo, este trabajo no se concluyó para su publicación.

1.4. Farmacología y farmacia hospitalaria

Los profesionistas farmacéuticos colaboraron con la Secretaría de Salud realizando los trabajos que permitieron elaborar la Guía Farmacoterapéutica de Emergencia para pacientes con COVID-19.

Esta guía surgió de la necesidad de contar con una herramienta que permitiera orientar al personal de salud, en la selección y uso de la medicación considerada como

un tratamiento potencial (off of label), y correlacionarla con el curso de la enfermedad.

Esta guía constituyó una referencia para la prescripción y administración de medicamentos, cumpliendo los lineamientos del Uso Racional de Medicamentos (URM).

Por lo anterior, se pusieron a disposición los medicamentos emergentes que, de acuerdo con la literatura científica nacional e internacional, se habían encontrado en el manejo de la COVID-19.

Se integraron los 9 (nueve) principios activos de mayor utilización en esas fechas de la pandemia: azitromicina, cloroquina, hidroxicloroquina, inmunoglobulina G, interferón β, lopinavir/ritonavir, nitazoxanida, remdesivir y tocilizumab. Para cada uno de ellos se elaboró una infografía, una ficha farmacoterapéutica completa y una guía de referencia rápida para facilitar su consulta en los diferentes momentos operativos de la Unidad Médica. Cabe mencionar que, analizando las manifestaciones de la OMS en esas fechas respecto a hidroxicloroquina y lopinavir/ritonavir, se consideró necesario mantenerlos en esta guía, a fin de que el personal de salud tuviera presente los riesgos que implicaba su utilización y el porqué de su amplia difusión como tratamiento potencial.

Esta guía tuvo como objetivo apoyar la toma de decisiones directivas y operativas en las instituciones del sector salud, en la selección y políticas para la contención de la pandemia de COVID-19. Asimismo, esta información podría ser adaptada por el equipo multidisciplinario: médicos, farmacéuticos y enfermeros, entre otros, para cada paciente en específico, basados en el juicio independiente del profesional de la salud, considerando las necesidades del paciente y los recursos disponibles en cada centro hospitalario.

1.5. Industria farmacéutica

La Industria Farmacéutica, que en nuestro país es operada principalmente por profesionales farmacéuticos, jugó un rol destacado al lograr las Autorizaciones de Emergencia de distintas autoridades de salud en varios países, dentro de ellos el nuestro, para vacunas y medicamentos.

En el desarrollo de la pandemia, se aumentó la producción de los medicamentos que, a pesar de no tener indicaciones autorizadas para la nueva enfermedad, por referencias científicas se asumía podrían tener determinados niveles de eficacia ante el Coronavirus SARS-CoV-2.

Medicamentos como hidroxicloroquina, azitromicina, nitazoxanida, tocilizumab, betametasona y paracetamol, entre otros, incrementaron su demanda al ser utilizados en la atención de pacientes contagiados por el virus.

Posteriormente y una vez logradas las Autorizaciones de Emergencia de vacunas, se logró la fabricación en nuestro país de alguna de mayor demanda para apoyar el abasto de la intensiva campaña de vacunación.

En el avance de la pandemia se lograron Autorizaciones de Emergencia para medicamentos con indicación terapéutica específica para la enfermedad y fueron apareciendo distintos antivirales y anticuerpos monoclonales que se incorporaron a la terapéutica para la atención de pacientes positivos a SARS CoV-2.

Dentro de estos productos, recibieron autorizaciones: Remdesivir, Molnupiravir, Paxlovid, Tocilizumab, Sotrovimab, Casirivimab y Imvedimab, entre otros.

2. CONSECUENCIAS DE LA COMPLEJIDAD DE LA PANDEMIA EN SUDAMÉRICA *(G. SEQUERA)*

La Pandemia por SARS-CoV-2 vino a cambiar el mundo, vino a traer una normalidad que ya no es igual a la anterior. Tenemos que retroceder un poco más de 100 años para rememorar algo similar en la envergadura y en su globalidad en el impacto a la salud pública planetaria. No existen regiones del planeta que no hayan sido golpeadas por el virus, pero unas más que otras han perdido proporcionalmente más vidas, han tenido mayor impacto económico y social, y en otras aún se profundizan la impronta en la transformación política y cultural. Entre las 6 oficinas regionales de la OMS, la de las Américas es la que lidera entre las regiones con más países con la mayor tasa de mortalidad y letalidad global por COVID-19. Dentro de las Américas, es Sudamérica la región del mundo con mayor mortalidad acumulada en relación con su población. Es importante destacar que esta alta mortalidad observada en la región tiene otro condimento amargo, y es que está compuesta por una población relativamente joven, por lo tanto, la suma de los años de vida perdidos de estas muertes la vuelven a colocar entre las regiones del planeta con mayor pérdida de vidas humanas. Se estima que la población sudamericana perdió entre 3 a 4 años de esperanza de vida en los primeros años de la pandemia (Pifarré *et al.* 2021; Wang *et al.* 2020-2021).

Pero no todo es mortalidad, recordemos que la pandemia vino a tocar todos los aspectos de la vida (Abrams y Szefler 2020). En esta región el mundo, que se caracteriza por sistemas de salud y de protección social muy débiles, ha potenciado su mayor característica: la desigualdad. Es esta la que ha multiplicado más el proceso de dolor y sufrimiento en su población. Es inmensa la brecha en el acceso a la salud (como la prueba de diagnóstico, o a las vacunas) que hay entre los diferentes barrios de las capitales sudamericanas. Es inmensa también la brecha de la posibilidad de cumplir con las cuarentenas, quedarse en casa y no tener la necesidad de

salir a buscar el pan y exponerse al riesgo del contagio, enfermarse y meter el virus a la casa, donde además se convive con otras familias (Islam 2022). En el acceso a la información y la capacidad de poder distinguir su calidad dentro de la vorágine de «*infodemia e infoxicación*» existe también una gran fisura que mata (Bambra *et al.* 2020).

La falta de integración regional de sus países también jugó en contra en la región, perdiendo su fuerza como bloque negociador. El desafío de producir vacunas por separado y de negociar en conjunto en la pulseada global que fue la *diplomacia de vacunas*, dejó a varios países de la región fuera de los espacios de negociación. Esta diplomacia también tuvo efectos en las tasas de mortalidad de la región, postergando el inicio de campañas masivas de vacunación o retrasando esquemas completos ante las nuevas olas de COVID-19 que se venían (Sing *et al.* 2022).

La comisión Lancet valoró cómo la confianza en las autoridades se asocia a un mejor acatamiento de las medidas de cuidados y mayores coberturas con buenos ritmos en la vacunación de la población (Sach *et al.* 2022). increíblemente destacó y posicionó en los primeros lugares de dichos informes a China. Aunque Sudamérica cada vez está cayendo en una progresiva influencia económica del gigante de asiático, aún está en el área de influencia de Estados Unidos, y culturalmente el concepto de «*libertad*» está muy de la mano de criticar y ser bastantes escépticos con la autoridad, esto aún está muy vigente. Grandes movilizaciones políticas se han realizado en contraposición a medidas aplicadas por las autoridades nacionales y en otros casos por no hacerlas, como el caso de Brasil (Griffin *et al.* 2022). El culto a la movilización política, incitado también por oportunistas políticos partidarios, ha generado cambios en ministros de salud en plena pandemia de casi todos los países de la región, y hasta ahora, sin excepción ningún presidente o partido político volvió a ganar elecciones posteriores a estos años de pandemia. Todos se retiran con indicadores de popularidad y prestigio muy bajos.

Pero hay elementos positivos a esta postpandemia. Se han catalizado procesos de informatización de diversos sistemas de gestión pública, algo que se veía venir pero que se aceleró durante la pandemia. Se destaca entre todos los países planes de mejora en los sistemas de protección social, reformas que fortalecen los sistemas sanitarios, no solo en infraestructura o capacidades humanas, sino en la protección, en el cuidado y en el hacer cumplir derechos de la población.

La capacidad de resiliencia de los sistemas de protección social activos, de los sistemas de salud, pero principalmente de la población en general, es tal vez la mayor fuerza que tiene la región (Haldane *et al.* 2021). Al no tener una población muy envejecida como otras zonas del mundo, donde varios de sus países están en la etapa de mejor aprovechamiento de su bono demográfico y otros recién entrando en él, genera condiciones de recuperación casi inmediatas.

Actualmente se están realizando desde la coordinación de la OPS/OMS y desde otros bloques subregionales como el Mercosur, esfuerzos regionales para empoderar la zona en la generación de cierta independencia en la producción de insumos mínimos para emergencias sanitarias como elementos de protección personal, medicamentos, biológicos, producción de vacunas, etc. Dentro de una generación de cadena de valor que incluya a diversos países en su producción y cuidar de esta manera el abastecimiento de la región en su conjunto. El norte global no ha mostrado su mejor cara en esta crisis, y un sur global no unido en la emergencia solo genera más dolor y muerte para sus habitantes, que termina impactando económicamente a sus países (Medina Hernández *et al.* 2022).

Otro de los grandes aprendizajes de la Pandemia es que su comprensión y sus posibles maneras de enfrentar deben ser elaboradas mediante un coro polifónico multisectorial y disciplinario. Centrar la narrativa pandémica solamente desde el mundo médico es un gran error de aproximación al problema y solo genera errores de muerte. Más allá de las ciencias de la salud, incluir a la discusión a las ciencias sociales, las ciencias de la comunicación, la filosofía, la economía u otras ciencias más duras como las matemáticas puras, la ingeniería o la física. Todas son fundamentales, no cometamos el error como la OMS de no admitir por varios meses que el SARS-CoV-2 era virus que se transmite por aerosoles, y esto porque las evidencias existentes, aunque contundentes no venían de científicos de la salud. A esta visión crítica llamamos hoy Salud Pública Basada en la Evidencia Plus (EBPH+), donde es inevitable tener que revisar evidencias y revistas que no sean exclusivamente médicas (Bautista-Molano 2022).

El otro elemento fundamental es reconocer lo que nos alertan los científicos. Es que, si vemos en su extensión la línea histórica de las epidemias en la humanidad, la Pandemia por SARS-CoV-2 realmente no es ninguna novedad (Roper 2022). Hoy la globalidad y el nivel de movilidad con el estilo de vida del humano moderno genera mayores riesgos con más probabilidades de explosiones epidémicas, con gérmenes de cualquier tipo, pero principalmente virus de origen zoonótico. Dicho esto, subrayo el actual mensaje de la comunidad científica con respecto al cambio climático y los esfuerzos que ya debemos estar realizando. No esperemos que también aquí sea tarde, a este ritmo el cambio climático dejará a la actual pandemia como una anécdota menor.

3. PANDEMIA EN EL PERÚ, CONSECUENCIAS EN LA SALUD Y LA EDUCACIÓN DE LA POBLACIÓN *(J. ALIAGA)*

El presente artículo trata de los acontecimientos importantes durante la pandemia por la COVID-19 que tuvieron consecuencias en la salud y la educación de la población.

El 15 de marzo se emite el Decreto Supremo (DS) N.º 044-2020-PCM (2020) que declara Estado de Emergencia Nacional a consecuencia del brote del COVID-19 provocada por el coronavirus SARS-CoV-2, documento que establece las principales pautas a seguir, como el aislamiento social obligatorio (cuarentena que se mantuvo hasta junio 2020), limitación a la libertad de tránsito de las personas que solamente podían movilizarse a actividades relacionadas con la alimentación y el mantenimiento de la salud, se dictaron medidas dirigidas a reforzar el Sistema Nacional de Salud. A la semana, se observó incumplimiento de lo establecido, con aglomeraciones en los mercados y en los paraderos del transporte público. El gobierno no mejoró la atención de primer nivel ni las emergencias de los hospitales, no se capacitó al personal de salud, se presentaron carencias de infraestructura, de medicamentos e indumentaria especial para el personal de salud, al 22 de marzo ya había 10.048 muertes (Salazar 2020).

Los diferentes medios de comunicación transmitían en forma constante las medidas que se deberían tener para evitar el contagio, en especial el distanciamiento entre las personas, el no dar abrazos a los familiares y amigos (distanciamiento emocional), uso de mascarilla, lavado de manos en forma constante, etc. Hubo mensajes por las redes sociales con medidas exageradas como el control permanente de la temperatura del cuerpo y la saturación de oxígeno.

La cuarentena comenzó a originar problemas económicos, en especial a los trabajadores informales, que tienen que trabajar diariamente para tener ingresos y sostener a su familia. Hay personas que viven en lugares hacinados, la mayor parte no tienen servicios básicos como agua y desagüe. En esta población el nivel de contagio fue alto. El sector informal es casi el 75 % de la población económicamente activa (PEA) (Garrido 2020).

3.1. Salud

La pandemia demostró la carencia en: infraestructura, profesionales de salud y medicamentos; los enfermos rebasaron la atención en los hospitales.

En el tratamiento inicial se usaron productos de acuerdo con la sintomatología de los pacientes, los más usados fueron el paracetamol, ibuprofeno, dextrometorfano, loratadina para el tratamiento ambulatorio; anticoagulantes, corticoides, azitromicina para el tratamiento hospitalario, algunos productos usados como la hidroxicloroquina y la ivermectina no se tenía la certeza de su beneficio. En la Resolución Ministerial (R.M.) N.º 270-2020-MINSA, del 08 de mayo (2020), fueron incluidos para el tratamiento de la COVID-19 junto a otros productos: hidroxicloroquina 400 mg, ivermectina (6 mg/ml) para tratamiento de casos leves de COVID-19, azitromicina 500 mg para el tratamiento de casos moderado y severo de COVID-19. Con R.M. N.º 839-2020/MINSA (2020), del 12 de octubre de 2020, se retira el uso de hidroxicloroquina, azitromicina e ivermectina en el tratamiento de los pacientes con COVID-19 hospitalizados. Se continúo prescribiendo ivermectina como preventivo, a nivel de las farmacias y boticas se vendían sin prescripción, las personas lo tomaban como preventivo, muchas veces con una sobremedicación. Durante el 2020, se gastó 500 % más en la importación de ivermectina en comparación con el 2019 (Ciriaco 2021).

Posteriormente se recomendó que la hidroxicloroquina y la ivermectina no deben utilizarse para el tratamiento de COVID-19 en ninguna de sus fases (González-Zamora 2020).

Hubo sobremedicación, un paciente que solamente tenía tos, todavía no se tenía los resultados de la prueba de detección, en la prescripción tenía siete medicamentos, incluían levofloxacino y dexametasona, medicamentos que están contraindicados para pacientes leves de coronavirus y pueden generar efectos adversos severos (Lira 2021).

Los factores de riesgo de letalidad fueron la edad, el sexo y las comorbilidades; el 67,8 % de los fallecidos fueron adultos mayores y 29,8 % adultos; el 69,2 % fueron varones de todo el rango de edades (Garmendia-Lorena 2022). Según el Ministerio de Salud, en el 2020 el número de fallecidos fue de 92.000, a fines de noviembre del 2022 fue de 217,000.

A marzo del 2023, el número de personas mayores de 18 años vacunadas con tres dosis fue de 70 %, con la cuarta dosis el 23 %.

Los sistemas sanitarios se concentraron en la atención de la pandemia, descuidando otros servicios, por ejemplo, la vacunación a los niños para otras patologías y sus respectivos controles, posteriormente se comenzó a usar la telemedicina para los diferentes servicios de los establecimientos de salud públicos y privados.

Las enfermedades crónicas se incrementaron desde el 2016 al 2021, la hipertensión (4.5 puntos porcentuales) y la Diabetes Mellitus (2 puntos porcentuales). En los dos últimos años, el chequeo para descartar algún tipo de cáncer sufrió una reducción de 8,3 % comparado con el año 2019 (Hancco-Saavedra *et al.* 2022).

En la tuberculosis, la búsqueda de sintomáticos respiratorios cayó del 3,7 % al 1,7 % en el 2021. El porcentaje de niños con terapia preventiva con isoniacida disminuyó bruscamente del 73,7 % en el 2017 al 48,4 % en el 2021. El número de casos de tuberculosis multidrogo resistente (TBMDR) subió de 1679 casos el 2018 a 2205 casos el 2021 y el número de casos de tuberculosis extremadamente resistente (TBXDR) subió de 51 casos el 2020 a 82 casos el 2021 (Somocurcio-Vílchez 2022).

En la población se generó un miedo natural por la falta de conocimiento o por informaciones alarmantes en las redes sociales, la mayoría de las personas se adaptaron, pero en otras se convirtió en un miedo muy intenso (terror), originando problemas de salud mental que se manifestaron en incertidumbre, inseguridad y discapacidad. Los trastornos mentales se incrementaron alrededor de tres veces en comparación a períodos sin pandemia, la ansiedad y la depresión fueron los más frecuentes, estuvieron asociados a: la cuarentena; no poder ver a su pareja o familiares; no poder trabajar; la información del número de muertos y contagiados; usar un medio de transporte público; haber sido infectado por la COVID-19 (Saavedra *et al.* 2022).

3.2. Educación

Antes de la pandemia, en las escuelas públicas ya había problemas de infraestructura y aprendizaje (mayores en las zonas urbanas que en las zonas rurales), en la pandemia hay que sumarle el mayor abandono de los estudiantes por causas familiares, económicas o carencias tecnológicas; la falta de clases presenciales por dos años, influyeron negativamente en los estudiantes en su proceso de aprendizaje, en su bienestar y en la socialización, causándoles en muchos casos depresión y ansiedad.

La deserción escolar siempre fue un problema, se agravo en la educación a distancia. En el 2020, 300 mil estudiantes interrumpieron sus estudios, en el 2021 la cifra fue de 124.533, la deserción está vinculada a la carencia económica, problemas familiares y al embarazo adolescente (la tasa en el área rural es de 22,8 %,). Respecto a la calidad del aprendizaje, en el 2019, solo el 17,7 % de los alumnos de segundo de secundaria podía resolver problemas matemáticos y de cada 100 alumnos, solo 14 entendían lo que leían (Villegas 2022). Es probable que la calidad de aprendizaje haya empeorado, por el momento no existe información.

Con la educación virtual los padres tuvieron que actuar como asistentes de docencia; responder las preguntas sobre la situación que se vivía; estar muy cerca de los hijos; lamentablemente, la mayoría de los padres no actuaron de esta forma, se generó en los niños problemas de aprendizaje y de conducta.

La función del cerebro es aprender, incrementando las conexiones neuronales con un mayor crecimiento de dendritas, la mayoría de estas conexiones se producen en los primeros años de vida del niño, un entorno favorable produce un adecuado crecimiento; si las condiciones son adversas se desarrollan menores conexiones o conexiones inadecuadas, si los niños viven con miedo y terror, aprenden a exagerar sus dolencias físicas y emocionales, si viven en un ambiente agresivo, aprenden a ser provocadores de conflictos. Por la presencia en el cerebro de las neuronas espejo, los niños aprenden el lenguaje corporal (expresiones, gestos y posturas) que comunican los diferentes estados afectivos (Ll Braidot 2016). Los niños y jóvenes responderán de acuerdo con la formación y educación que reciban en casa o en el colegio.

Algunas universidades privadas empezaron a dictar clases virtuales desde el inicio de la pandemia, la mayoría, tanto públicas como privadas, empezaron en junio del 2020; en junio del 2021 el total de universidades públicas podían dictar clases virtuales; en el primer semestre del 2021 algunas privadas iniciaron clases presenciales.

En el 2023 se aprobó el retorno presencial obligatorio a las aulas (Correa 2023). A nivel de pregrado, la mayor parte debe ser presencial para incentivar la participación en diferentes actividades universitarias; a nivel de post grado, una parte de las clases será en forma virtual (Miani 2022).

En la pandemia las clases virtuales fueron importantes para la educación, logrando, como algo positivo, alguna autonomía en el aprendizaje, pero no fue accesible para todos. Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), a julio del 2022, el uso de Internet en zonas rurales cayó hasta 43 % de su población, la brecha ha crecido de 35 % a 37 %, entre julio del 2021 y julio del 2022 (Hurtado de Mendoza 2023). La deserción, en el segundo semestre del 2019 fue 12,6 %, en el primer trimestre 2021 fue 18,3 %, 50 mil estudiantes adicionales interrumpieron sus estudios universitarios (Mejía 2023).

La universidad no solamente sirve para adquirir nuevos conocimientos, su importancia está en la formación de seres humanos, los alumnos deben aprender a: adquirir capacidad de trabajar en equipo, generar nuevos conocimientos, ser innovadores y creativos, participar, con respeto y tolerancia, al intercambio de ideas con sus profesores y compañeros, ser líderes en las actividades que elijan; el profesor ayuda a construir un propósito que el alumno desea, le indica los posibles caminos a seguir, lo acompaña en la ruta hasta cierto momento; las clases presenciales son la esencia de la educación.

El exceso de uso de la tecnología virtual por los jóvenes, lo acostumbran a que muchas cosas se puedan conseguir en forma rápida, por lo que carecen de paciencia, actúan debilitando sus habilidades socioemocionales

y empobreciendo su capacidad para construir relaciones sociales y afectivas (Mejía 2023).

En la pandemia los problemas se magnificaron, generaron principalmente un daño emocional, repararlos tomarán varios años, los sistemas de salud deben fortalecerse, especialmente los de atención primaria, dando importancia a la salud mental; en educación, tenemos que recordar que el ser humano es eminentemente social, necesita de la conexión humana, las clases presenciales fortalecerán las habilidades socioemocionales, con intercambio de ideas sobre los temas de investigación, de aprendizaje o sobre los diferentes aspectos de la vida como son los deportes, la cultura y la política, no podemos formar personas escépticas, nuestros estudiantes jugarán un rol protagónico en el desarrollo del país en un futuro cercano.

4. APORTE DE LA PROFESIÓN FARMACÉUTICA ANTE LA CRISIS SANITARIA: EXPERIENCIA CON LA COVID-19 EN COSTA RICA *(A. FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ)*

El 16/03/2020 se declara el estado de Emergencia Nacional en todo el territorio de la República de Costa Rica debido a la situación de emergencia sanitaria provocada por la enfermedad COVID-19. Los profesionales farmacéuticos comprometidos con sus distintas áreas de trabajo fueron fundamentales en la atención de esta. A continuación, se describen iniciativas y actividades relevantes que algunos sectores de la profesión llevaron a cabo en respuesta a la pandemia por la COVID-19.

4.1. Introducción

La COVID-19 es el nombre de la enfermedad infecciosa viral originada por el nuevo tipo de coronavirus SARS-CoV-2. La Organización Mundial de la Salud (OMS 2020) lo caracterizó como una pandemia el 11/03/2020. En Costa Rica, el 06/03/2020 se confirmó el primer caso de un paciente con la COVID-19, lo que puso en alerta a las distintas organizaciones sanitarias locales para su pronta contención. El 16/03/2020, el gobierno declara el estado de Emergencia Nacional, mediante el Decreto Ejecutivo N.º 42227-MP-S (Comisión Nacional de Prevención de Riesgos y Atención de Emergencias 2020). A continuación, se describen las iniciativas y actividades más relevantes que los farmacéuticos de Costa Rica llevaron a cabo en respuesta a la pandemia por la COVID-19, desde el Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica (COLFAR), los servicios de farmacia de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), el MINSA, el área docente de la Facultad de Farmacia (FF) de la Universidad de Costa Rica y el Centro Nacional de información de Medicamentos (CIMED).

4.2. Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica (COLFAR)

Desde la declaración de emergencia nacional, el COLFAR llevó a cabo dos acciones diferentes. Por un lado, la elaboración y emisión una serie de campañas, criterios, disposiciones, guías y lineamientos con impacto directo en el quehacer de la profesión farmacéutica y el bienestar de la población, por otro lado, la coordinación de cursos en línea y charlas vía *webinar*, en las cuales colaboraron múltiples profesionales, con el fin de mantener actualizados a los farmacéuticos en su quehacer en relación con la pandemia (tabla 1).

4.3. Servicios de Farmacia de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS)

La CCSS es la institución pública encargada de la seguridad social en la República de Costa Rica, incluyendo los servicios de salud, pensiones y protección social requeridos por ley. Desde el ámbito de actividades y competencias de la Coordinación Nacional de Servicios Farmacéuticos, durante la atención de la pandemia por la COVID-19, se implementaron tres estrategias macro para poder dar continuidad a la medicación de la población, en las que participaron los farmacéuticos de la institución en los tres niveles de atención a lo largo y ancho de todo el territorio nacional (Caja Costarricense del Seguro Social 2020). Las estrategias fueron:

1. Solicitud de preparación de recetas electrónicas por medio de un canal de llamado 905-MISALUD y de activación de receta por otros medios: teléfono, correo electrónico, etc. (Caja Costarricense del Seguro Social 2020).
2. Entrega a domicilio de medicamentos con el apoyo de entes públicos y privados (Servicios Generales de la CCSS, Correos de Costa Rica, UCR, Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), Municipalidades, entre otros) (Caja Costarricense del Seguro Social 2020).
3. Solicitud de preparación adelantada de recetas subsecuentes por un canal digital (formulario Web) (Caja Costarricense del Seguro Social 2020).

Además, los Servicios de Farmacia elaboraron una serie de protocolos, procedimientos y recomendaciones para la atención segura de usuarios (Sandoval 2022), como se pueden ver ejemplos en la tabla 2.

Desde la Dirección de Logística de la CCSS, liderada desde el año 2020 por un farmacéutico, se realizaron una

Tabla 1. Listado de acciones llevadas a cabo por el COLFAR como respuesta a la declaración de estado de emergencia nacional por la COVID-19 en Costa Rica (Montero 2021)

Fecha	Acciones
16/03/2020	Guía de actuación del profesional en farmacia antes casos sospechosos de infección por coronavirus SARS-CoV-2 (versión1).
17/03/2020	Facebook *live*: El papel del farmacéutico ante la COVID-19.
20/03/2020	Lineamientos generales para el envasado de alcohol en gel en farmacias comunitarias durante el período de emergencia debido a la alerta sanitaria por coronavirus (COVID-19). Emitido en conjunto con el MINSA.
31/03/2020	Lineamientos generales para el despacho al domicilio de medicamentos psicotrópicos y estupefacientes debido a la alerta sanitaria por coronavirus (COVID-19) (versión 1). Emitido en conjunto con el MINSA.
01/04/2020	Disposiciones para la adaptación de los horarios de operación de los establecimientos farmacéuticos de acuerdo con las medidas sanitarios impuestas por el MINSA.
03/04/2020	Lineamientos generales para farmacias y actuación del farmacéutico debido a la alerta sanitaria por coronavirus (COVID-19) (versión 1). Emitido en conjunto con el MINSA.
8/04/2020	Webinar: La farmacia de comunidad como pilar fundamental en la prevención y atención de COVID-19.
13/04/2020	Procedimiento de fiscalización virtual de establecimientos farmacéuticos ante la pandemia por COVID-19.
13/04/2020	Guía de actuación del profesional en farmacia frente a la pandemia causada por COVID-19 (versión 2).
14/04/2020	Webinar: Terapias farmacológicas específicas disponibles en el tratamiento COVID-19. Evidencia científica.
20/04/2020	Guía para el despacho de medicamentos prescritos por telemedicina debido a la alerta sanitaria declarada por la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2.
20/04/2020.	Otorgamiento temporal de cuota especial de colegiatura para los farmacéuticos afectados laboral y económicamente por la pandemia de COVID-19.
24/04/2020.	Disposiciones administrativas relativas a los trámites de renovación de permisos de operación y autorizaciones de regencia farmacéutica de los establecimientos farmacéuticos.
27/04/2020-17/05/2020	Primera edición del curso virtual de autoaprendizaje: El farmacéutico y la farmacia frente a la pandemia por COVID-19.
12/05/2021	Webinar: Medidas de desinfección frente al SARS-CoV-2. Riesgos y beneficios.
18/05/2020	Guía de actuación del profesional en farmacia para realizar visita médica virtual como medida temporal frente a la pandemia causada por COVID-19 (versión 1).
19/05/2020	Webinar: Métodos de detección para COVID-19. En conjunto con ACANAFAR.
09/06/2020	Webinar: Medicina basada en la evidencia en la pandemia de la COVID-19. En conjunto con ACANAFAR.
15/06/2020-5/07/2020	Segunda edición del curso virtual de autoaprendizaje: El farmacéutico y la farmacia frente a la pandemia por COVID-19.
02/07/2020	Disposición de uso obligatorio de mascarilla o careta en las farmacias con el fin de proteger la salud del personal y la de los pacientes que requieren el servicio.
19/06/2020	Webinar: Desarrollo de terapias con plasma convaleciente para COVID-19. En conjunto con la Conferencia Iberoamericana de Facultades de Farmacia.
14/07/2020	Webinar: Genómica en la vigilancia nacional en el contexto de la pandemia por COVID-19. En conjunto con el Consejo Nacional de Investigación en Salud (CONIS) y ACANAFAR.
21/07/2020	Webinar: Impacto social, emocional y laboral de la emergencia por COVID-19. En conjunto con ACANAFAR.
04/08/2020	Webinar: Retos en la investigación y la innovación farmacéutica en tiempos de la pandemia por COVID-19. En conjunto con ACANAFAR.
12/08/2020	Webinar: El rol del farmacéutico asistencial costarricense ante la pandemia por COVID-19.

Fecha	Acciones
13/08/2020	Webinar: Desafíos de sedación en pacientes COVID-19 en las unidades de cuidado intensivo. En conjunto con la Asociación de Farmacéuticos Hospitalarios.
08/09/2020	Criterio técnico del Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica sobre el dióxido de cloro y su uso médico presentado ante la Sala Constitucional de la Corte Suprema de Justicia.
29/09/2020	Extensión de la prórroga del permiso de operación y de la autorización de regencia farmacéutica de los establecimientos farmacéuticos y disposiciones administrativas relativas a estos por motivo de la pandemia por COVID-19.
24/12/2020	Inicia la vacunación contra COVID-19. Por iniciativa del COLFAR los farmacéuticos se incluyen en el grupo 1 de vacunación como trabajadores de primera respuesta. Los que laboran en el sector público comienzan a recibir la vacuna. (Grupo 1a priorizado). Vacunas disponibles en el país: BioNTech-Pfizer y AstraZeneca.
19/02/2021	Lineamientos generales para el despacho al domicilio de medicamentos psicotrópicos y estupefacientes por parte de las farmacias privadas, debido a la alerta sanitaria por coronavirus (COVID-19), versión 2. Emitido en conjunto con el MINSA.
Mayo 2021	Campaña informativa en redes sociales: Importancia de vacunarse contra COVID-19.
12/05/2021	Webinar: Vacuna COVID-19 Astra Zeneca. Aspectos clínicos y regulatorios.
26/05/2021	Webinar: ¿Qué debe conocer el farmacéutico sobre la vacuna contra el SARS-CoV-2 fabricada por Pfizer BioNTech?
Marzo y mayo 2021	MINSA implementa la estrategia de vacunación del grupo 1b priorizado que incluye a los profesionales de la salud del sector privado. A petición del MINSA, el COLFAR recoge la información y envía 8 listados de farmacéuticos que laboran en el sector privado para que se les administre la vacuna.
30/06/2021	Webinar: La vacuna de la influenza en el contexto de la pandemia por COVID-19.
28/07/2021	Webinar: Caracterización de la vacuna contra COVID-19 desarrollada por Janssen de Johnson & Johnson.
25/08/2021	Webinar: Prevención de la falsificación de las vacunas contra COVID-19 en Costa Rica.
16/09/2021	Webinar: Vacunación contra la COVID-19. Mitos y verdades dirigida a la población. En conjunto con el Club de Leones de Costa Rica.
Del 15/09 al 22/11/2021	Campaña informativa en redes sociales: Seguridad y eficacia de las vacunas contra SARS-CoV-2.
21/10/2021	Ministerio de Salud informa el cierre de la estrategia de vacunación del grupo 1b) priorizado (incluye los farmacéuticos que laboran en el sector privado).
25/10/2021	Inicia la aplicación de la tercera dosis de vacuna contra COVID-19. Los farmacéuticos se incluyen en el grupo 1 de vacunación como trabajadores de primera respuesta. Vacunas disponibles en el país: BioNTech-Pfizer y AstraZeneca.
noviembre y diciembre 2021	Campaña informativa en redes sociales: Importancia de vacunarse contra COVID-19.

serie de acciones para la atención de la emergencia por la COVID-19, entre las más relevantes: abastecimiento de productos almacenables dentro del rango óptimo adecuado; adquisición de equipo de protección para los funcionarios, necesarios para mantener la continuidad de los servicios en un ambiente de seguridad para los usuarios; habilitación de herramientas electrónicas para poder cargar compras por la COVID-19 y la gestión de compras expeditas, fundamentadas en los mecanismos de excepción de la normativa de contratación administrativa. La Dirección de Logística coordinó toda la implementación de congeladores para el almacenamiento de las vacunas que llegaron a finales de diciembre de 2020.

4.4. Ministerio de Salud (MINSA)

Los farmacéuticos del MINSA, desde la Dirección de Regulación de Productos de Interés Sanitario, entre otras muchas iniciativas, participaron en la creación de resoluciones administrativas para la autorización de vacunas y medicamentos en la situación de emergencia por la COVID-19 (Salas 2022) (tabla 3).

Las resoluciones que avalan el reconocimiento de las autorizaciones brindadas por Autoridades Reguladoras Estrictas permitieron el rápido acceso a las vacunas y medicamentos para prevenir y tratar la COVID-19. La autorización de uso de la vacuna contra COVID-19 de

Tabla 2. Participación de Farmacias CCSS en la atención de la pandemia por la COVID-19. Dirección de Red Integrada Central Sur

Protocolos elaborados por los Servicios de Farmacia.
Estrategia domiciliar especial para pacientes positivos por COVID-19 y a sus Familiares.
Estrategia de priorización en la entrega de medicamentos en los toldos de atención a sintomáticos respiratorios.
Estrategia de entrega de medicamentos por período mayor a un mes.
Preparación anticipada de medicamentos a pacientes crónicos.
Fortalecimiento de trabajo en red para la contención de cierres de farmacias por casos positivos en sus funcionarios.
Levantamiento de listados de sustitutos disponibles entre diferentes servicios de Farmacia.
Fortalecimiento de las barreras de protección en las ventanillas de atención al público.
Implementación de consulta farmacéutica por medios alternativos (consulta no presencial de atención farmacéutica para pacientes crónicos con enfermedad no transmisibles, así como una guía de intervención para pacientes con COVID-19 positivo que requieran acompañamiento farmacéutico por problemas relacionados con su medicación.

Tabla 3. Resoluciones administrativas y Decretos que vinieron a facilitar el acceso de las vacunas y medicamentos contra COVID-19 (Salas 2022)

DM-RM-7905-2020 – Diciembre del 2020 – Resolución Administrativa de Autorización de Uso de las Vacunas contra COVID-19 basado en el reconocimiento de la Autorización de Comercialización o Autorización de Uso en Emergencia de Autoridades Reguladoras Estrictas o precalificadas por la Organización Mundial de la Salud.
Decreto Ejecutivo 42751 – Diciembre del 2020 – Reglamento para la autorización sanitaria para el desalmacenaje y adquisición de medicamentos no registrados por entidades estatales con funciones de salud pública o seguridad social y para la autorización del desalmacenaje en caso de necesidad pública.
MS-DM-RM-0933-2021 – Abril del 2021 – Resolución Administrativa de Autorización de Uso de las Vacunas contra COVID-19 en el sector privado basado en el reconocimiento de la Autorización de Comercialización o Autorización de Uso en Emergencia de Autoridades Reguladoras Estrictas o precalificadas por la Organización Mundial de la Salud o en la Lista de Uso de Emergencia de Organización Mundial de la Salud.
MS-DM-RM-1363-2022 – Enero del 2022 – Resolución administrativa de Autorización de Uso e Importación de los Medicamentos para tratar la COVID-19 basado en el reconocimiento de la Autorización de Comercialización o la Autorización de Uso en Emergencia de Autoridades Reguladoras Estrictas o de Medicamentos recomendados por la Organización Mundial de la Salud.

Pfizer-BioNTech fue aprobada el 15 de diciembre del 2020 y permitió que Costa Rica fuera uno de los primeros países en la región de iniciar la campaña de vacunación contra COVID-19. La vacuna COVID-19 de AstraZeneca fue aprobada el 26 de febrero del 2021 y permitió ampliar las vacunas disponibles en la campaña de vacunación. Y finalmente, el 23 de febrero del 2022, se autorizó el medicamento Molnupinavir como unas de las terapias farmacológicas disponibles para el tratamiento de la enfermedad por COVID-19 de leve a moderada en adultos (Salas 2022).

El Centro Nacional de Farmacovigilancia realizó reportes periódicos semanales y acumulativos sobre seguimiento de las reacciones adversas atribuibles a las vacunas (Informe de Sospechas de Reacciones Adversas a Medicamentos 2019).

Los colegas farmacéuticos del MINSA dedicaron gran parte de su tiempo a atender diversas demandas y acciones legales presentadas por grupos antivacunas del país. Estos grupos, más que afectar el progreso de la ciencia, generan un impacto social negativo al propagar información errónea entre la población.

4.5. Docencia desde la Facultad de Farmacia (FF), Universidad de Costa Rica (UCR)

La UCR es la única universidad pública que imparte la carrera de Licenciatura en Farmacia en el país.

Antes de la pandemia, datos del 2017 mostraban que Costa Rica ocupaba el cuarto lugar en acceso a Tecnologías de la Información y Comunicación (TIC) en Latinoamérica, según el Índice de Desarrollo Humano, siendo

superado por Uruguay, Argentina y Chile. A nivel mundial, ocupaba el puesto número 60 (Internet Society 2023).

A partir del 20 de marzo de 2020, el Centro Coordinador Institucional de Operaciones de la UCR estableció el trabajo remoto. Como resultado, los docentes de Farmacia (en su mayoría farmacéuticos) adaptaron sus funciones y llevaron a cabo una transición sin precedentes al trasladar su oferta académica a plataformas virtuales. En tiempo récord se migró de una docencia 100 % presencial una modalidad 100 % virtual para todos los cursos teóricos, logrando continuar con el proceso formativo del estudiantado. La docencia virtual continuó en distintos porcentajes, dependiendo de cada curso por el resto del año 2020 y 2021. Por otro lado, el Consejo Asesor y las demás comisiones de la FF tuvieron reuniones virtuales el resto de año. Algunas de las estrategias didácticas que se implementaron para continuar con la docencia en la emergencia sanitaria por la COVID-19 fueron (Internet Society 2023):

— Cursos adaptados a la modalidad virtual en la plataforma institucional de entornos virtuales: Mediación Virtual. Esta es gestionada por la Unidad de Apoyo a la Docencia Mediada con Tecnologías de la Información y la Comunicación (METICS) de la Vicerrectoría de Docencia.
— Los cursos prácticos, como los laboratorios, dentro de un marco de flexibilidad curricular, se valoraron y se adaptaron para ser impartidos virtualmente por medio de iniciativas que permitieron adecuaciones metodológicas, reorganización de contenidos, adaptación y, en algunos casos muy puntuales, reprogramación temporal.

Los cursos que no pudieron ser adaptados a entornos virtuales debido a su naturaleza, tales campos clínicos y prácticas en hospitales e industrias, fueron suspendidos con la intención de ofrecerlos en semestres posteriores. La UCR aumentó los recursos audiovisuales de acompañamiento para profesores y estudiantes (Salazar 2020). Siguiendo la misma línea, La FF implementó una campaña de comunicación «Me quedo en casa» y una serie de materiales con recomendaciones para el distanciamiento social.

4.6. Centro Nacional de Información de Medicamentos (CIMED)

El CIMED es una entidad adscrita al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la UCR. Durante toda la crisis sanitaria el CIMED resolvió consultas, dio seguimiento farmacoterapéutico, charlas, entrevistas a medios de comunicación masiva y brindó criterios técnicos sobre medicamentos relacionados a la COVID-19 y sus vacunas (Rocha-Palma 2020-2021).

IN MEMORIAM

Durante la pandemia, muchos farmacéuticos arriesgaron sus vidas para continuar brindando la atención que los pacientes requerían. Lamentablemente, se reportaron varias muertes de farmacéuticos que se contagiaron de la COVID-19 ejerciendo su profesión, trabajaban la mayoría en el área asistencial y uno de ellos en visita médica. El COLFAR les realizó un homenaje en el marco de su 125 aniversario, el 21 de abril de 2022, donde se les colocó un mural conmemorativo en un costado del ingreso al auditorio (Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica 2022). Es importante asegurarnos que sus nombres no se olviden. Para todas estas personas, una eterna gratitud.

BIBLIOGRAFÍA

ABRAMS, E.M. & SZEFLER, S.J. (2020), COVID-19 and the Impact of Social Determinants of Health. The Lancet Respiratory Medicine 8(7): 659-661.

BAMBRA, C., RIORDAN, R., FORD, J. & MATTHEWS, F. (2020), The COVID-19 Pandemic and Health Inequalities. Journal of Epidemiology and Community Health 74(11): 964-968.

BAUTISTA-MOLANO, W. (2022), Situación actual de la medicina basada en la evidencia: los retos de la pandemia. Revista Médica 29(2): 7-9.

CAJA COSTARRICENSE DEL SEGURO SOCIAL (2020), *Memoria Institucional 2020*. San José, Costa Rica.

CIRIACO, M. (2021), Perú importó 500 % más ivermectina durante la pandemia. El Comercio 15 de febrero de 2021: 07.

COLEGIO DE FARMACÉUTICOS DE COSTA RICA (2022), *Listado de farmacéuticos fallecidos por la COVID-19*. Material no publicado. San José, Costa Rica. Marzo 2022.

COMISIÓN NACIONAL DE PREVENCIÓN DE RIESGOS Y ATENCIÓN DE EMERGENCIAS (2020), Plan General de Emergencia de los Decretos N.º 42227-MP-S y N.º 42296-MP-S: Estado de Emergencia ante la situación provocada por la enfermedad del COVID-19. San José, Costa Rica.

CORREA, N. (2023), Retorno a clases 2023. El Comercio. 01 de marzo 2023: 18.

D.S. N.º 044-2020-PCM (Presidencia del Consejo de Ministros) que declara Estado de Emergencia Nacional por las graves circunstancias que afectan la vida de la Nación a consecuencia del brote del COVID-19. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/566448/DS044-PCM_1864948-2.pdf?v=1584330685

FACULTAD DE FARMACIA (2020), *Informe anual 2020*. Universidad de Costa Rica; San José, CR.

GARMENDIA-LORENA, F. (2020), La evolución y características de la pandemia de COVID-19 en el Perú. Diagnóstico 59(3): 117-122.

GARRIDO, J. (2020), Un experimento natural. El Comercio 22 de marzo de 2020: 21.

GONZALES-ZAMORA, J. (2020), Tratamiento farmacológico de COVID-19: Conferencia de la Peruvian American Medical Society (PAMS). Diagnóstico 59(3): 141-144.

GRIFFIN, S. (2022), COVID-19: Commission Describes «Massive Global Failures» of Pandemic Response. BMJ 378: o2237.

HALDANE, V., DE FOO, C., ABDALLA, S.M., JUNG, A.S., TAN, M., WU, S. *et al.* (2021), Health Systems Resilience in Managing the COVID-19 Pandemic: Lessons from 28 Countries. Nature Medicine 27(6): 964-980.

HANCCO-SAAVEDRA, J., ZÁRATE-SCARSI, B., ORTEGA-GUILLÉN, E. *et al.* (2022), Situación de las enfermedades no transmisibles en el Perú durante pandemia de COVID-19. Diagnóstico 61(4): 344-349.

HURTADO DE MENDOZA, C. (2023), Conectividad digital en emergencia: crece la brecha del uso de Internet en el Perú. El Comercio Día 1. 20 de febrero de 2023: 03.

INFORME DE SOSPECHA DE REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS (2019) [Internet], Ministeriodesalud.go.cr. Disponible en: https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos-left/documentos-ministerio-de-salud/regulacion-de-la-salud/farmacovogilancia/informe-de-sospecha-de-reacciones-adversas-a-medicamentos [accedido 1 de abril de 2023].

INTERNET SOCIETY [Internet], Acceso a internet y educación: Consideraciones clave para legisladores. Disponible en https://www.internetsociety.org/es/resources/doc/2017/internet-access-and-education/ [accedido 1 de abril de 2023].

ISLAM, A. (2022), Work-from/at/for-Home: COVID-19 and the Future of Work – A Critical Review. Geoforum 128: 33-36.

LIRA, A. (2021), Recetas fatales: el creciente peligro de la sobremedicación en el COVID-19. El Comercio 13 de mayo de 2021: 8.

LL BRAIDOT, N. (2016), *Sácale partido a tu cerebro*. Ediciones Granica S.A. Pp. 54-56.

MEDINA-HERNÁNDEZ, E.J., BARCO-LLERENA, E. & VILLALBA-ACEVEDO, J.L. (2022), Preparación y reacción de los países del sur y norte global frente al COVID-19: un análisis comparado. HiSTOReLo Revista de Historia Regional y Local 14(30): 251-292.

MEJÍA, J. (2023), La juventud hoy. El Comercio 14 de enero de 2023: 23.

MIANI, J. (2022), Universidades apuestan por más presencialidad en 2023: lo que viene en pregrado y posgrado. El Comercio Día 1. 19 de diciembre de 2022: 12.

MOLINA, O. (2021), Promesas rotas: pandemia e interrupción de estudios universitarios. El Comercio. 25 de julio de 2021: 22.

MONTERO, N. (2021), 1000 días de COVID. Trabajo no publicado. Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica; septiembre de 2021 (Información suministrada por el Colegio de Farmacéuticos de Costa Rica al proyecto de la Federación Internacional Farmacéutica Preparación para una pandemia: 1.000 días de COVID).

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (2020), La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia [Internet]. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=15756:who-characterizes-covid-19-as-a-pandemic&Itemid=1926&lang=es#gsc.tab=0 [accedido 1 de abril de 2023].

PIFARRÉ, I., AROLAS, H., ACOSTA, E., LÓPEZ-CASASNOVAS, G., LO, A., NICODEMO, C., RIFFE, T. *et al.* (2021), Years of Life Lost to COVID-19 in 81 Countries. Scientific Reports 11(1): 3504.

R.M. N.° 270-2020-MINSA (Ministerio de Salud), Prevención, diagnóstico y tratamiento de personas afectadas por COVID-19. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/694719/RM_270-2020-MINSA.PDF?v=1588984025

R.M. N.° 839-2020/MINSA, del 12 de octubre de 2020, Manejo de personas afectadas por COVID-19 en los servicios de hospitalización. Disponible en: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1365531/R.M.%20839-2020.pdf.pdf?v=1602703011

ROCHA-PALMA, M. (2021), *Informe Anual CIMED 2020-2021*. UCR; San José, Costa Rica.

ROPER, W.L. (2022), Science, Health, and Truth. Science 377(6601): 7.

SAAVEDRA, J., ALIAGA-GIRALDO, K., CASTILLO-MARTELL, W. *et al.* (2022), Estudio epidemiológico sobre el impacto de la pandemia COVID-19 en la salud mental de la población de Lima Metropolitana. Diagnóstico 61(3): 147-186.

SACHS, J.D., KARIM, S.S.A., AKNIN, L., ALLEN, J., BROSBØL, K., COLOMBO, F. *et al.* (2022), The Lancet Commission on Lessons for the Future from the COVID-19 Pandemic. The Lancet 400(10359): 1224-1280.

SALAS, D. (2022), *Informe de fin de gestión*. Ministerio de Salud; San José, Costa Rica.

SALAZAR, S. (2020), *Informe de Labores de la Vicerrectoría de Docencia Mayo 2020 a Octubre 2020*. Universidad de Costa Rica.

SALAZAR, F. (2020), Lamento de una cigarra. El Comercio 22 de marzo de 2020: 21.

SANDOVAL, Á. (2022), *Participación de Farmacias CCSS en la atención de la pandemia por COVID-19*. Presentación de PowerPoint. Material no publicado. Dirección de Red Integrada Central Sur, CCSS San José, Costa Rica.

SINGH, B., KAUR, J. & CHATTU, V.K. (2022), Global Vaccine Inequities and Multilateralism Amid COVID-19: Reconnaissance of Global Health Diplomacy as a Panacea? Health Promotion Perspectives 12(4): 315-324.

SOMOCURCIO-VÍLCHEZ, J. (2022), La tuberculosis en el Perú y los cambios debido a la pandemia de COVID-19. Diagnóstico. 61(4): 350-354.

VILLEGAS, M. (2022), La educación en el gobierno del maestro Castillo. El Comercio. 07 de noviembre de 2022: 22.

WANG, H., PAULSON, K.R., PEASE, S.A., WATSON, S., COMFORT, H., ZHENG, P. *et al.* (2022), Estimating Excess Mortality Due to the COVID-19 Pandemic: A Systematic Analysis of COVID-19-Related Mortality, 2020-21. The Lancet 399(10334): 1513-1536.

Capítulo XXXI
COVID-19: de pandemia a endemia

Juan Jesús Gestal Otero
Profesor emérito de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Santiago de Compostela.
Académico numerario de las Reales Academias de Medicina y de Farmacia de Galicia

En todas las epidemias de transmisión por vía aérea se aplican secuencialmente dos grandes conjuntos de medidas preventivas, en un primer momento las medidas de contención, consistentes en disminuir al máximo los contactos interpersonales para tratar de impedir la difusión de la infección en la comunidad, y más tarde, cuando la infección ya se encuentra ampliamente extendida, con transmisión comunitaria sostenida, medidas de mitigación, centradas en la protección de las personas más vulnerables y la atención a los casos graves de la enfermedad que precisan asistencia hospitalaria, para minorizar sus efectos negativos. La fase de contención de la pandemia de COVID-19 se extendió desde el inicio de la pandemia, en nuestro país el 9 de marzo de 2020, hasta el 28 de marzo de 2022 en que se pasó a la fase de mitigación. El 5 de mayo de 2023, el director general de la OMS declaró el fin de la pandemia, pero el SARS-CoV-2 no se ha ido, ha quedado entre nosotros en situación endémica.

1. Evolución de la pandemia de COVID-19 en España durante la fase de contención

Durante la fase aguda de la pandemia, hasta el 28 de marzo de 2022, se produjeron en España seis olas o períodos epidémicos (fig. 1)[1].

Primer período: Desde el inicio de la pandemia hasta el 21 de junio de 2020, fecha en la que se terminó el primer estado de alarma en España, una vez finalizada la primera ola epidémica de COVID-19.

Segundo período: Desde el 22 de junio hasta el 6 de diciembre de 2020, punto de inflexión de la incidencia acumulada (IA) a 14 días de casos de COVID-19, entre el segundo y el tercer período epidémico, correspondiente a la segunda ola.

Tercer período: Desde el 7 de diciembre de 2020 hasta el 14 de marzo de 2021, punto de inflexión de la IA a 14 días de casos de COVID-19, entre el tercer y el cuarto período epidémico, correspondiente a la tercera ola.

Cuarto período: Desde el 15 de marzo de 2021 hasta el 19 de junio, punto de inflexión de la IA a 14 días de casos de COVID-19, entre el cuarto y el quinto período epidémico, correspondiente a la cuarta ola.

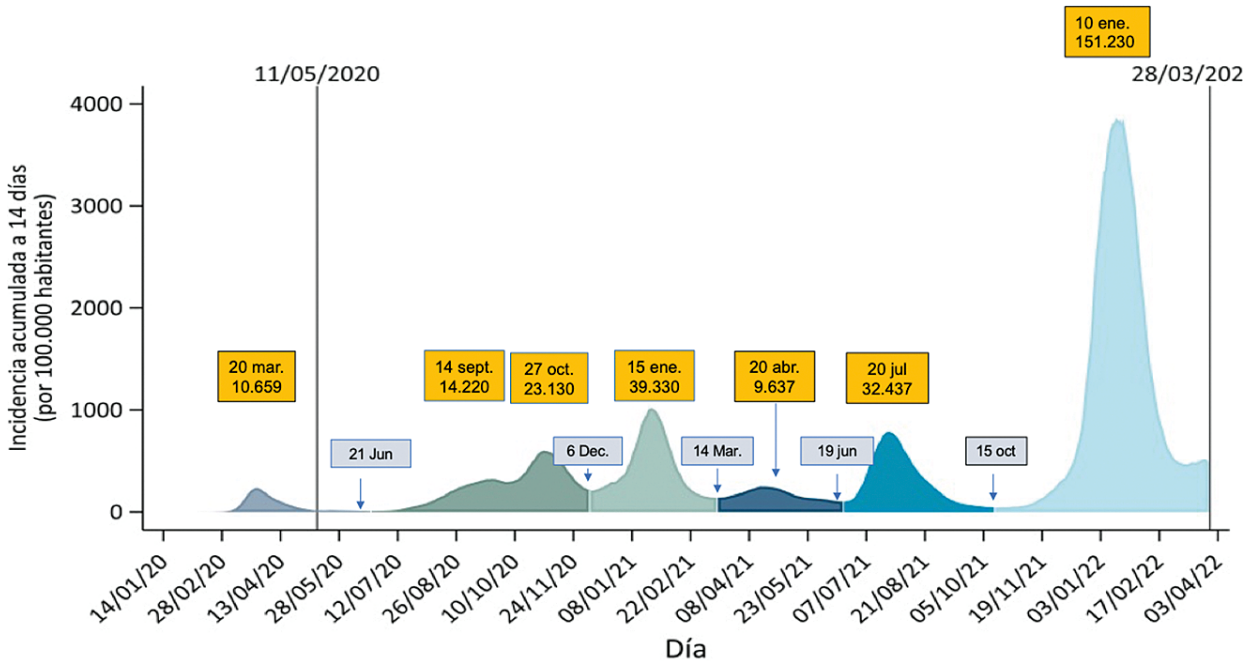
Quinto período: Desde el 20 de junio de 2021 hasta el 13 de octubre, punto de inflexión de la IA a 14 días de casos de COVID-19, entre el quinto y el sexto período epidémico, correspondiente a la quinta ola.

Sexto período: Desde el 14 de octubre de 2021 hasta el 27 de marzo de 2022, momento del fin de la fase aguda o de contención y de comienzo de la fase de mitigación con la entrada en vigor de la nueva estrategia de vigilancia, correspondiente a la sexta ola.

Los períodos epidémicos u olas más letales han sido, de más a menos, el primero, el segundo y el tercero, y los con mayores incidencias el sexto, tercero y quinto (fig. 2)[2].

1. Situación de COVID-19 en España a 28 de junio de 2022. Equipo COVID-19. RENAVE. CNE. CNM. ISCIII). https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/Informes%20COVID-19/INFORMES%20COVID-19%202022/informe%20n%C2%BA%20135%20Situaci%C3%B3n%20de%20COVID-19%20en%20Espa%C3%B1a%20a%2028%20de%20junio%20de%202022.pdf

2. Casos de COVID-19 notificados a RENAVE desde el inicio de la pandemia. RENAVE. Informe n.º 124. Situación de la COVID-19 en España a 30



Fuente: RENAVE. Informe nº 122. Situación de COVID-19 en España a 16 de marzo de 2022

Figura 1. Períodos epidémicos de la COVID-19 en España, con fechas y número de casos de los picos

En España, el primer caso se detectó en la isla de La Gomera el 31 de enero, un caso leve importado, y nueve días después se detectó otro, también importado, en Palma de Mallorca. La península no se afectó hasta el 24 de febrero en que aparecieron los primeros casos en las comunidades de Madrid, Cataluña y Valencia, que rápidamente aumentaron y se fueron extendiendo al resto de CC.AA. A partir del 8 de marzo, el crecimiento se descontroló especialmente en la Comunidad de Madrid lo que propició que al día siguiente la Consejería de Sanidad estableciera un nivel de contención reforzada y el gobierno de la Comunidad de Madrid cerrara toda la actividad educativa, con lo que los estudiantes universitarios volvieron a sus casas, algunos de ellos infectados, ayudando a difundir el virus por toda España.

A partir de ahí todo va a discurrir rápidamente. El 11 de marzo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declara la pandemia, y el día 14 el gobierno del Estado aprueba el Real Decreto 463/2020, de 14 de marzo, por el que se declara el primer estado de alarma para la gestión de la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19[3], procediéndose al confinamiento de todo el país. La duración del estado de alarma era por quince días y fue prorrogado seis veces, finalizando la última prórroga a las 0 horas del 21 de junio de 2020. Durante dicho período se decretó la restricción de la circulación de los ciudadanos; la garantía en el suministro de alimentos y productos necesarios para la salud pública; la regulación de la apertura de la hostelería, la restauración y los locales donde se realizan actividades culturales, artísticas, deportivas y similares; la priorización del trabajo a distancia, y la suspensión de la actividad escolar presencial. El ministro de sanidad tuvo bajo sus órdenes directas a las autoridades civiles de las administraciones públicas de todo el país, en particular las sanitarias.

Similares medidas fueron adoptadas por los restantes países europeos (fig. 3)[4].

de marzo de 2022. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/Informes%20COVID-19/INFORMES%20COVID-19%202022/Informe%20n%C2%BA%20124%20Situaci%C3%B3n%20de%20COVID-19%20en%20Espa%C3%B1a%20a%2030%20de%20marzo%20de%202022.pdf

3. https://www.boe.es/eli/es/rd/2020/03/14/463

4. Hoja de ruta europea para el levantamiento de las medidas de confinamiento contra el coronavirus. https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/factsheet-lifting-containment-measures_es.pdf

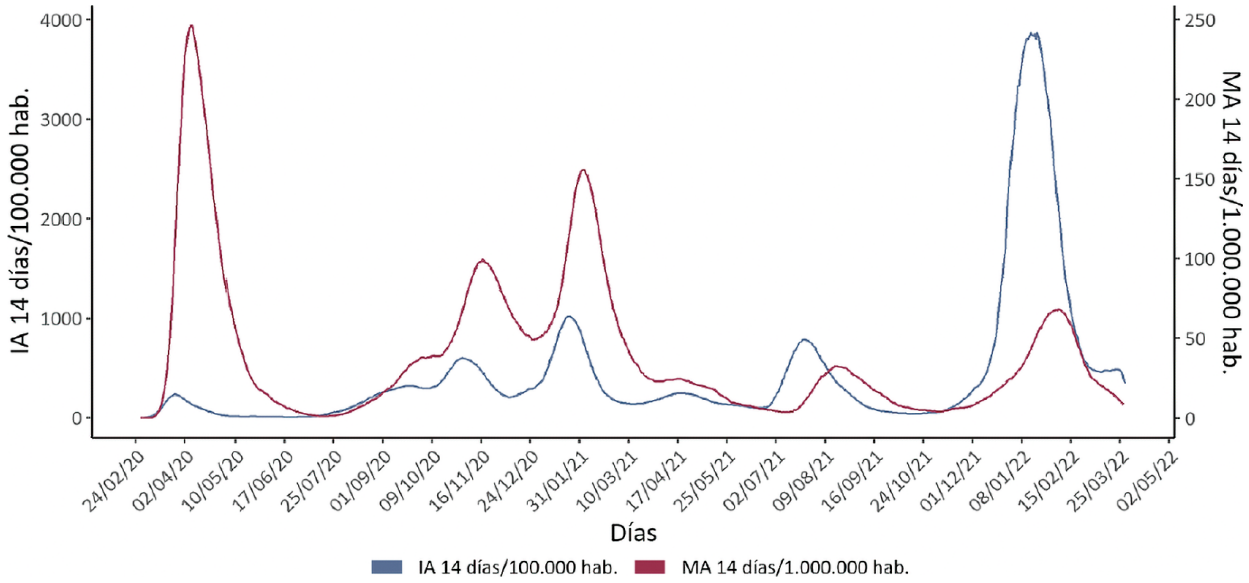


Figura 2. Evolución de la Incidencia acumulada (IA) y mortalidad acumulada (MA) a 14 días a nivel nacional. Situación a 30 de marzo de 2022

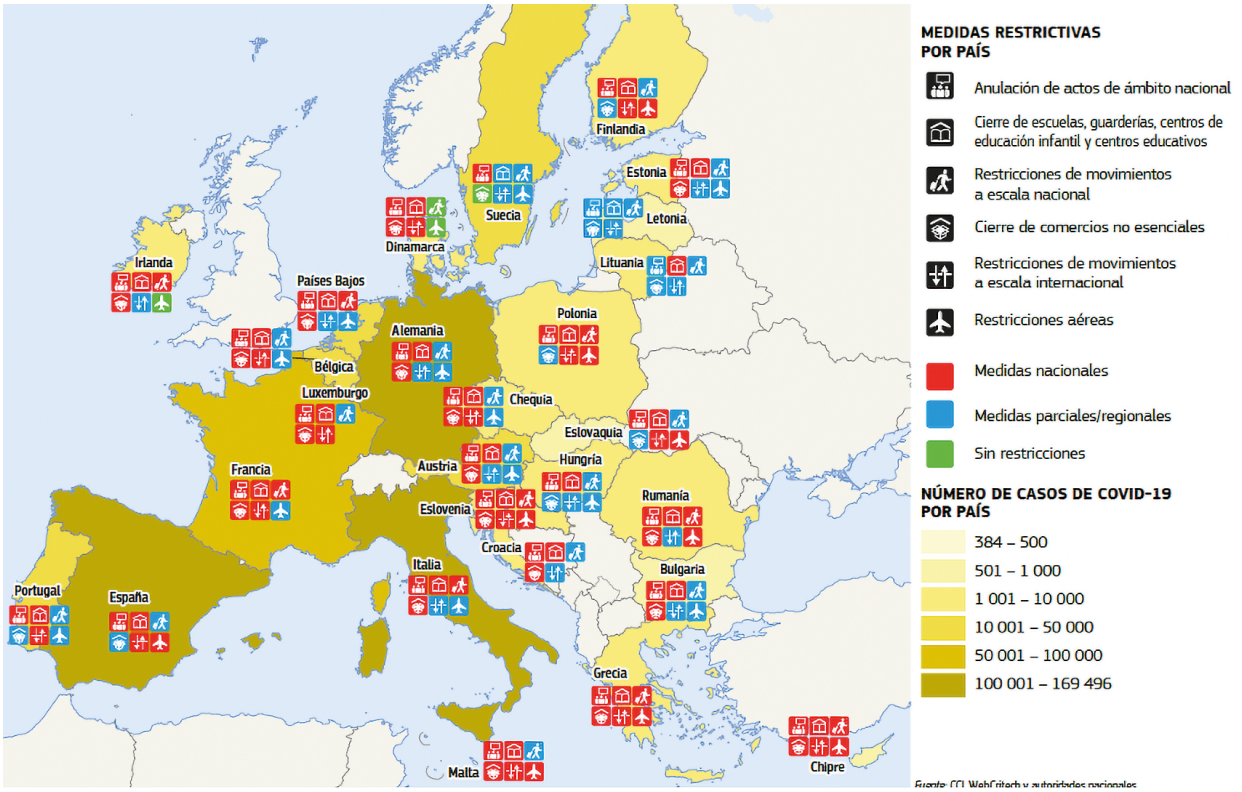


Figura 3. Medidas de restricción frente a la COVID-19 en la UE. Mapa del CCI del 13 de abril de 2020 a las 16.00 horas (UTC)[5]

La primera ola fue la más letal con 250.273 casos y 20.534 defunciones con diagnóstico confirmado por PCR, las reconocidas por el gobierno, aunque la cifra real de fallecidos a los que no se les había hecho test, pero murieran de COVID-19, es más del doble. Según el MoMo, del 11 de marzo al 9 de mayo de 2020 se han estimado 46.430 excesos de defunciones por todas las causas, 38.803 en mayores de 74 años[6], la mayoría probablemente causadas directamente por la COVID-19 (fig. 4) y

5. https://cnecovid.isciii.es/covid19/#ccaa

6. MoMo. Vigilancia de los excesos de mortalidad por todas las causas. Situación a 29 de marzo de 2022 https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/MoMo/Documents/InformesMoMo2022/MoMo_Situacion%20a%2029%20de%20marzo_CNE.pdf

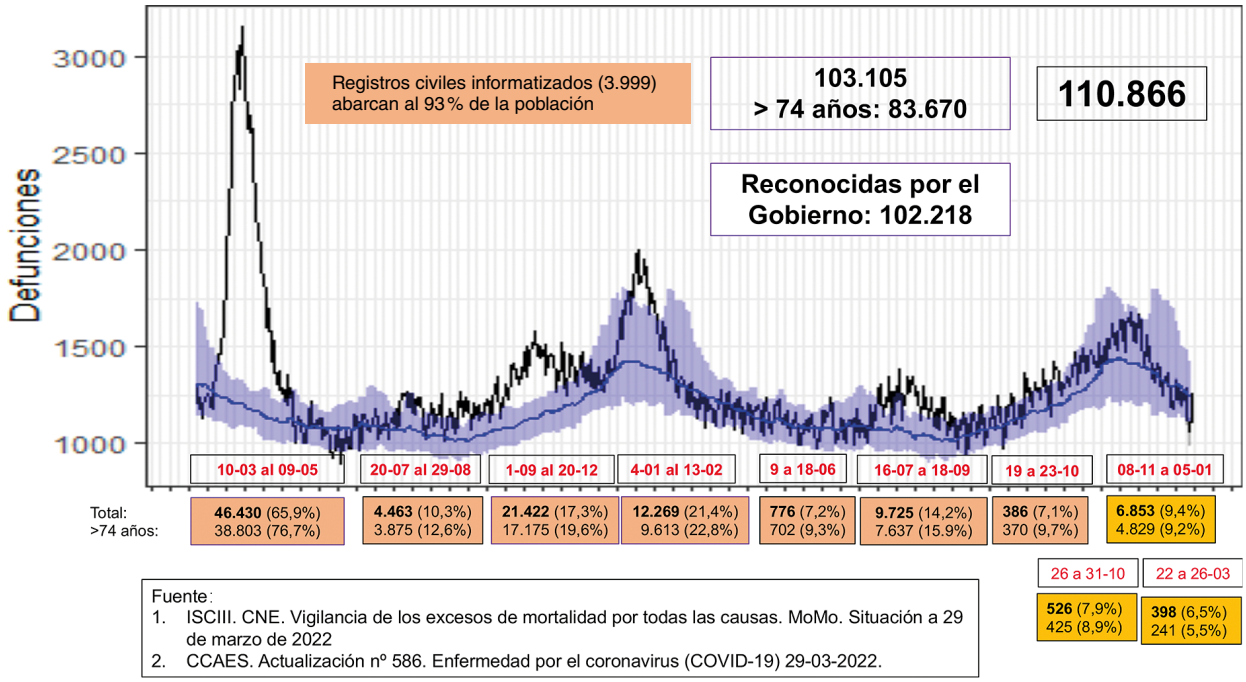


Figura 4. Mortalidad por todas las causas esperadas y observadas en España. Desde diciembre 2019 hasta el 29 de marzo de 2022. Defunciones observadas (negro) y defunciones estimadas (azul), con el intervalo de confianza al 99% (banda azul) (Fuente: MoMo)

el resto indirectamente por la falta de atención sanitaria a otras enfermedades provocada por la pandemia. En las residencias de mayores murieron cerca de 20.000 residentes, muchos de ellos sin confirmación diagnóstica pues no se disponía de test suficientes.

Tras la publicación de la «*Hoja de ruta común europea para el levantamiento de las medidas de contención de la COVID-19*»[7], presentada el 15 de abril de 2020 por la presidente de la Comisión Europea y el presidente del Consejo Europeo, los Estados miembros de la Unión Europea comenzaron a planificar las distintas fases que permitiesen reanudar las actividades económicas y sociales, de modo que se minimizase cualquier repercusión sobre la salud de las personas y no se sobrecargasen los sistemas sanitarios, atendiendo a las orientaciones de la OMS.

En España, a finales de abril se alcanzó el pico de la curva epidémica y esta comenzó a descender lentamente, y el gobierno comenzó a preparar la desescalada aprobándose en el Consejo de Ministros del martes 28 de abril el *Plan para la transición hacia una nueva normalidad*[8, 9]. Dicho plan contemplaba cuatro fases de desescalada, de una duración mínima de dos semanas, que se aplicarían de manera asimétrica, en función del cumplimiento de cada provincia o isla de ciertos marcadores que figuraban en un *Panel integral*[10, 11]. Posteriormente se fueron publicando también unas *Guías de fases*[12, 13, 14].

Se puso en marcha la desescalada y se fueron cubriendo etapas, avanzando hacia lo que se llamaba «nueva normalidad». El encierro fue ejemplar y duró hasta mediados de junio, pero se acercaba el verano y «había que salvar el turismo», y se salió apresuradamente sin tener la enfermedad completamente controlada.

Para iniciar la desescalada, la OMS había establecido las siguientes condiciones: que esté controlada la

7. Hoja de ruta común europea para el levantamiento de las medidas de contención de la COVID-19. https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/joint_eu_roadmap_lifting_covid19_containment_measures_es.pdf
8. Plan para la transición hacia una nueva normalidad. 28 de abril de 2020. https://www.lamoncloa.gob.es/consejodeministros/resumenes/Documents/2020/PlanTransicionNuevaPlanTransi.pdf
9. https://www.lamoncloa.gob.es/covid-19/Paginas/plan-transicion.aspx
10. Previsión orientativa para el levantamiento de las limitaciones de ámbito nacional establecidas en el estado de alarma, en función de las fases de transición a una nueva normalidad. https://www.lamoncloa.gob.es/consejodeministros/resumenes/Documents/2020/28042020_Anexo%20II%20FASES.pdf
11. Cuadro de criterios para el cambio de fase. Plan para la transición hacia una nueva normalidad. https://www.lamoncloa.gob.es/serviciosdeprensa/notasprensa/sanidad14/Documents/2020/08052020_Criterios.pdf
12. Plan para la transición hacia una nueva normalidad: Guía de la fase 3. 31 de mayo de 2020. https://www.lamoncloa.gob.es/Documents/31052020PlanTransicionGuiaFase3.pdf
13. Plan para la transición hacia una nueva normalidad: Guía de la fase 2, Modificada el 1 de junio de 2020. https://www.lamoncloa.gob.es/covid-19/Documents/01062020_Plan_Transicion_Guia_Fase_2.pdf
14. Plan para la transición hacia una nueva normalidad: Guía de la fase 2, Modificada el 1 de junio de 2020. https://www.lamoncloa.gob.es/covid-19/Documents/01062020_Plan_Transicion_Guia_Fase_1.pdf

transmisión; que exista capacidad para detectar nuevos casos y a sus contactos; que se minimicen los riesgos de brotes en lugares especiales como centros sanitarios y residencias; que las escuelas y centros de trabajo, comercio y ocio cuenten con protocolos y medidas de prevención que los hagan seguros frente a la COVID-19; que el SNS tenga capacidad para detectar casos importados, y que los ciudadanos estén plenamente informados, comprometidos y capacitadas para adecuar sus comportamientos a la nueva situación.

Muchas de ellas no se cumplían, ya que no se había controlado la transmisión y el virus continuaba circulando en la comunidad; la capacidad del sistema de salud para detectar nuevos casos y sus contactos, aunque mejorada, aún no era adecuada ya que la Atención Primaria seguía estando sobrecargada y, con la mayor frecuencia de casos leves y asintomáticos que se esperaban, más lo iba a estar; no se habían contratado suficientes rastreadores y la preparación de las residencias de mayores no había mejorado mucho como pudimos comprobar después.

Cuando salimos del estado de alarma a la nueva normalidad se nos dijo que había terminado la pandemia, pero pronto comprobamos que no. Entonces el gobierno del Estado desapareció dejando la gestión a las comunidades autónomas, sin coordinación, y cada una organizó el seguimiento de los contactos a su manera, y no se debió de hacer bien porque, en poco tiempo, la transmisión de la enfermedad volvió a estar fuera de control, comenzando la segunda ola a mediados de julio.

Entonces, el rastreo de los contactos era clave para cortar las cadenas de transmisión, pero no se hizo bien. Durante el encierro no se había organizado y ahora, sin tiempo, era necesario contratar, formar rastreadores y organizar su trabajo. Cada Comunidad Autónoma lo hizo a su manera y se llevó en secreto, seguramente porque no podía enseñarse. Se apuntó la cifra de 1 rastreador por cada 5.000 habitantes como la óptima, que no se cumplió ni de lejos por ninguna Comunidad Autónoma. Para que les sirviese de ayuda se diseñaron aplicaciones (app) para móviles, que no tuvieron mucho éxito en ningún país europeo. En España la app que se utilizó fue RadarCOVID.

Cada vez se producían más casos y las medidas que se adoptaban eran blandas, para no dañar la economía. Hasta el 14 de agosto no volvió a reunirse el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, destacando entre las medidas adoptadas la prohibición de fumar en espacios al aire libre, volviendo a reunirse el 27 de agosto, en esta ocasión con la Conferencia Sectorial de Educación, adoptando veintinueve medidas y cinco recomendaciones, de cara a la próxima apertura de los centros escolares. La siguiente reunión fue el 9 de septiembre, acordando medidas relativas a la vacunación COVID-19, los cribados, la coordinación con las entidades locales y la puesta en marcha de nuevas rondas del estudio nacional de seroprevalencia[15].

A mediados de septiembre la curva de casos parecía haber alcanzado ya su punto máximo con una meseta que apuntaba a iniciar el declive, cuando de repente a principios de octubre comenzó a subir rápidamente, mientras lo hacía también en otros países europeos, aparentemente asociado a un aumento de las cargas virales, que habían ido creciendo desde agosto, tanto en los casos sintomáticos como en los asintomáticos, debido probablemente a las condiciones ambientales del otoño, que hacía temer lo que podría suceder en invierno si no se tomaban medidas adecuadas para reducir rápidamente la incidencia y poner bajo control la enfermedad (fig. 4).

El 30 de septiembre el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud (CISNS) acordó unas *Actuaciones coordinadas en Salud Pública para responder ante situaciones de especial riesgo por transmisión no controlada de infecciones causadas por el SARS-CoV-2* para municipios de más de 100.000 habitantes con incidencias acumuladas a 14 días, medidas hasta cinco días antes de la fecha de valoración, iguales o superiores a 500 casos/100.000 habitantes; el porcentaje de test positivos superior al 10 % en las dos semanas previas, y una ocupación de camas UCI por encima del 35 % de la dotación habitual de camas de la época pre-COVID-19. Dichos municipios tenían que adoptar las medidas que se indican en la tabla 1.

La incidencia de la enfermedad continuó aumentando y el 22 de octubre el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud aprobó el documento de *Actuaciones de respuesta coordinada*[16], que establece umbrales de indicadores principales e indicadores complementarios que clasifican el resultado de cada uno de ellos en riesgo bajo, medio, alto o muy alto.

En la tabla 2, se exponen los principales indicadores divididos en dos bloques: Bloque I: Indicadores

15. Estrategia estatal contra la segunda ola. Documento en revisión permanente. 17 de noviembre de 2020. https://www.google.es/search?q=Estrategia+estatal+contra+la+segunda+ola.+Documento+en+revisi%C3%B3n+permanente.+17+de+noviembre+de+2020.&btnK=Buscar+con+Google&sxsrf=AOaemvIYjAnaPxSsQDLXg4OjkAoFpx8kOw%3A1633347566966&source=hp&ei=7udaYYn9N63H_Qaj_ZLQDA&ifIsig=ALs-wAMAAAAAYVr1_unD-WSTgd6X2PTjWkFrkuOVz2DK&oq=google.es+maps&gs_lcp=Cgdnd3Mtd2l6EAEYAjIECCMQJzIECCMQJzIECCMQJzIFCAAQgAQyBQgAEIAEMgUIABCABDIFCAAQgAQyBQgAEIAEMgUIABCABDIFCAAQgAQ6DgguEIAEELEDEMcBENEDOggIABCABBCxAzoLCAAQgAQQsQMQgwE6CAguELEDEIMBOgoILhDHARDRAxAnOgsILhCABBDHARDRAzoHCAAQgAQQClCoPFi9T2DQZmgAcAB4AIABigGIAZgIkgEDMC45mAEAoAEB&sclient=gws-wiz

16. Estrategia estatal contra la segunda ola. Documento en revisión permanente. 17 de noviembre de 2020. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Estrategia_estatal_segunda_ola.pdf

Tabla 1. Medidas a adoptar en los municipios >100.000 habitantes que presenten incidencias a 14 días ≥500 casos/100.000 habitantes; > 10 % de test positivos, y >35 % de ocupación de camas UCI, establecidas por acuerdo del CISNS de 30 de septiembre[17]

A. Contacto social:
   1. Cierre perimetral.
   2. Máximo 6 personas evento familiar o social público o privado salvo convivientes y actividades laborales e institucionales o actividades en que se establezcan límites o medidas específicas.

B. Aforo máximo, distancia y horario.
   1. Lugares de culto: 1/3 garantizando distancia mínima interpersonal de 1,5 metros.
   2. Velatorios: 15 p exterior; 10 p interior; Comitiva: 15 p
   3. Establecimientos, locales comerciales y servicios abiertos al público:
      a) Aforo máximo 50 %
      b) Hora de cierre 22:00 horas, salvo las excepciones que se prevean.
   4. Establecimientos de hostelería y restauración y de juegos y apuestas:
      a) Aforo máximo 50 % en interiores y 60 % en exteriores.
      b) No consumo en barra
      c) Mesas distancia sillas otras mesas ≥1,5 metros
      d) Ocupación máxima 6 p/mesa
      e) No nuevos clientes a partir de 22:00 horas y hora de cierre 23:00 horas, a excepción de servicios de entrega de comida a domicilio.
   5. Academias, autoescuelas y centros privados de enseñanzas no regladas y centros de formación: Aforo máximo 50 %
   6. Instalaciones deportivas, tanto al aire libre como de interior.
      a) Aforo máximo 50 % en interiores y 60 % en exteriores.
      b) La práctica deportiva en grupos: Máximo 6 p
      c) En competiciones oficiales de ámbito estatal y carácter no profesional y competiciones internacionales bajo la tutela de Federaciones deportivas españolas: Protocolo de actuación para la vuelta de competiciones oficiales de ámbito estatal y carácter no profesional en la temporada 2020/2021, elaborado por el CSD.

C. Capacidades.
   1. Las comunidades autónomas con municipios en los que concurran las circunstancias enumeradas reforzarán sus capacidades para la detección precoz y el control de la enfermedad, así como en el ámbito de la atención sanitaria.

epidemiológicos del nivel de transmisión (incidencia acumulada, positividad y trazabilidad), y Bloque II: Indicadores de utilización de los servicios sanitarios (ocupación en planta y en UCI) y 21 indicadores complementarios que ayudan a valorar y caracterizar la situación (tabla 3).

De acuerdo con los indicadores se clasifica la situación como *Nueva normalidad* cuando la IA14 <20, las camas covid-19 en planta < 2 % y las camas UCI < 5 %; *Riesgo bajo* cuando la IA14 = 20-50, las camas covid-19 en planta están entre el 2-5 % y las camas UCI entre el 5-10 %; *Riesgo medio* cuando la IA14 está entre 50-150, la IA14 >65 entre 50-100, las camas covid-19 en planta entre 5-10 % y las camas UCI entre 10-15 %; *Riesgo alto* cuando la IA14 está entre 150-250, la IA14 >65 entre 100-150, las camas covid-19 en planta entre 10-20 % y las camas UCI entre 15-25 %, y *Riesgo extremo* cuando la IA14 > 250, la IA14 >65 > 150, las camas covid-19 en planta > 20 % y las camas UCI > 25 %.

La combinación del resultado de los indicadores, posiciona al territorio evaluado en un nivel de riesgo que se corresponde con cuatro niveles de alerta, clasificados de 1 a 4, modulando la decisión final sobre el nivel de alerta asignado no solo en el nivel de riesgo resultante de la combinación de los indicadores principales, sino también en función del nivel de riesgo de los indicadores complementarios, así como de otras variables relacionadas con el contexto socioeconómico, demográfico y de movilidad del territorio evaluado.

— *Nivel de alerta 1:* cuando al menos dos indicadores del bloque I y uno del bloque II están en nivel bajo y el resto de los indicadores en nueva normalidad.
— *Nivel de alerta 2*: al menos dos indicadores del bloque I y uno del bloque II están en nivel medio y el resto de los indicadores en un nivel inferior.
— *Nivel de alerta 3*: al menos dos indicadores del bloque I y uno del bloque II están en nivel alto y el del resto de los indicadores en un nivel inferior.

17. Ministerio de Sanidad. Resolución de 30 de septiembre de 2020, de la Secretaría de Estado de Sanidad, por la que se da publicidad al Acuerdo del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud sobre la Declaración de Actuaciones Coordinadas en Salud Pública para responder ante situaciones de especial riesgo por transmisión no controlada de infecciones causadas por el SARS-Cov-2, de fecha 30 de septiembre de 2020. BOE de 1 de octubre de 2020. https://www.boe.es/eli/es/res/2020/09/30/(1)/dof/spa/pdf

Tabla 2. Principales indicadores del documento de *Actuaciones de Respuesta Coordinada* aprobado por el CISNS el (22-X-20) y valoración del riesgo[18]

Indicadores		Fórmula de cálculo	Valoración de riesgo				
			Nueva normalidad	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
BLOQUE I: Evaluación del nivel de transmisión							
T1	Incidencia acumulada de casos diagnosticados en 14 días[1]	Casos confirmados (por fecha de diagnóstico) en 14 días * 100.000 / número de habitantes	≤25	>25 a ≤50	>50 a ≤150	>150 a ≤250	>250
T1'	Incidencia acumulada de casos diagnosticados en 7 días[1]	Casos confirmados (por fecha de diagnóstico) en 7 días * 100.000 / número de habitantes	≤10	>10 a ≤25	>25 a ≤75	>75 a ≤125	>125
T2	Incidencia acumulada de casos de 65 o más años diagnosticados en 14 días[1]	Casos ≥65 años confirmados (por fecha de diagnóstico) en 14 días * 100.000 / número de habitantes ≥ 65 años	≤20	>20 a ≤50	>50 a ≤100	>100 a ≤150	>150
T2'	Incidencia acumulada de casos de 65 o más años diagnosticados en 7 días[1]	Casos ≥65 años confirmados (por fecha de diagnóstico) en 7 días * 100.000 / número de habitantes ≥ 65 años	≤10	>10 a ≤25	>25 a ≤50	>50 a ≤75	>75
T3	Positividad global de las PDIA[2] por semana	Número de pruebas con resultado positivo en 7 días * 100 / Número de pruebas realizadas en 7 días	≤4%	>4% a ≤7%	>7% a ≤10%	>10% a ≤15%	>15%
T4	Porcentaje de casos con trazabilidad[3]	Número de casos diagnosticados con trazabilidad * 100 / Número total de casos confirmados diagnosticados los últimos 7 días	>80%	≤80% a >65%	≤65% a >50%	≤50% a >30%	≤30%
BLOQUE II: Nivel de utilización de servicios asistenciales por COVID-19							
A1	Ocupación de camas de hospitalización por casos de COVID-19[4]	Número de camas de hospitalización ocupadas por casos de COVID / Número total de camas de hospitalización en funcionamiento	≤2%	>2% a ≤5%	>5% a ≤10%	>10% a ≤15%	>15%
A2	Ocupación de camas de cuidados críticos por casos de COVID-19[4]	Número de camas de cuidados críticos ocupadas por casos de COVID / Número de camas de cuidados críticos totales en funcionamiento	≤5%	>5% a ≤10%	>10% a ≤15%	>15% a ≤25%	>25%

— *Nivel de alerta 4*: al menos dos indicadores del bloque I y uno del bloque II están en nivel muy alto y el resto de los indicadores en un nivel inferior.

En síntesis, tras la evaluación del riesgo, en base a los indicadores epidemiológicos, capacidad asistencial, capacidad de Salud Pública, características y vulnerabilidad de la población y las posibilidades de adoptar medidas de prevención y control, se adoptarían las medidas de prevención más adecuadas, consistentes en la limitación del número de personas no convivientes en reuniones, sobre todo en interiores; relacionarse en burbujas sociales estructuradas en grupos de convivencia estable; permanecer en el domicilio; promover actividades al aire libre, y medidas de distancia, higiene y prevención (higiene de manos frecuente, distancia de seguridad, ventilación y uso de mascarilla higiénica en exteriores y FFP2 en interiores).

El documento también establecía unas consideraciones generales (tabla 4) y medidas para situaciones de riesgo alto, medio y bajo, de acuerdo con los diferentes niveles de alerta (tabla 5) que con ligeras modificaciones se utilizaron a partir de entonces para gestionar la pandemia, junto con otras medidas excepcionales en el nivel 4 como cierres perimetrales, toque de queda y exigencia del certificado de vacunación que, fuera del estado

18. Acuerdo del CISNS sobre la declaración de «Actuaciones coordinadas en salud pública». Resolución de 30 de septiembre de 2020, de la Secretaría de Estado de Sanidad, BOE de 1 de octubre de 2020. https://www.boe.es/eli/es/res/2020/09/30/(1)

Tabla 3. Otros indicadores epidemiológicos y de capacidad complementarios

Indicadores	Fórmula de cálculo	Valoración de riesgo					Información
		Nueva normalidad	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	
Evaluación del nivel de transmisión							
Tendencia de casos diagnosticados (interpretar siempre en el contexto de la incidencia en el territorio)	Número de casos confirmados en los días 1 a 7 antes de la fecha – número de casos confirmados en los días 8 a 14 antes de la fecha * 100 / número de casos confirmados los días 8 a 14 antes de la fecha	Descendente o estable las últimas 4 semanas	Oscila sin incrementos sostenidos	Incrementos sostenidos de bajo nivel (<25 %)	Incrementos sostenidos intermedios (25-50 %) o incremento puntual importante (>50 %)	Incrementos sostenidos elevados (>50 %) o incremento puntual muy importante (>100 %)	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES)
Positividad de pruebas* en casos sospechosos en atención primaria (AP) por semana	Casos sospechosos en AP (consulta última semana) con prueba positiva * 100 / casos sospechosos en AP (consulta última semana) con resultado de prueba disponible	≤6 %	>6 a ≤10 %	>10 a ≤20 %	>20 a ≤30 %	>30 %	Declaración agregada semanal al Ministerio de Sanidad
Número de reproducción instantáneo (R_t)	Promedio de casos secundarios por cada caso detectado, calculado usando la serie de casos por fecha de inicio de síntomas, en promedio los días 5 a 15 antes de la fecha	≤1	>1 a ≤1,1	>1,1 a ≤1,5	>1,5 a ≤2	>2	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES). Información elaborada en las CCAA
Evaluación de la capacidad de diagnóstico precoz de casos							
Número de casos sospechosos por caso confirmado en 7 días	Número de casos sospechosos (AP y hospitales) en 7 días / Número de casos confirmados en esos 7 días	≤10	>10 a ≥7	>7 a ≥4	>4 a ≥2	<2	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA y SIVIES
Proporción de casos sospechosos en atención primaria (AP) con prueba* diagnóstica realizada	Nuevos casos sospechosos en AP con prueba realizada × 100 / nuevos casos sospechosos en AP en 7 días (por fecha de consulta)	>90 %	<90 a ≥85 %	<85 a ≥80 %	<70 a ≥80 %	<70 %	Declaración agregada semanal al Ministerio de Sanidad
Tasa de pruebas* realizadas	Número total de pruebas realizadas * 100.000 / Número total de habitantes	≥1.500	<1.500 a ≥1.000	<1.000 a ≥800	<800 a ≥600	<600	SERLAB
Número de pruebas* realizadas por caso confirmado en 7 días	Número total de pruebas realizadas en 7 días / Número total de casos confirmados en 7 días	≥30	<30 a ≥20	<20 a ≥10	<10 a ≥5	<5	SERLAB, SIVIES
Retraso diagnóstico	Mediana en días entre el inicio de síntomas en casos confirmados y la fecha de diagnóstico	≤1 día	>1 a ≤2 días	>2 a ≤5 días	>5 a ≤8 días	>8 días	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES)
Tiempo de diagnóstico	Mediana en días entre la fecha de consulta y la de diagnóstico	≤1 día	>1 a ≤2 días	>2 a ≤5 días	>5 a ≤8 días	>8 días	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES)
Evaluación del nivel de gravedad							
Tasa de hospitalizaciones por COVID, por 100.000 habitantes en 7 días	Número nuevos ingresos hospitalarios por COVID en 7 días * 100.000 / Número de habitantes en el territorio	≤10	>10 a ≤20	>20 a ≤30	>30 a ≤40	>40	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA

Indicadores	Fórmula de cálculo	Valoración de riesgo					Información
		Nueva normalidad	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	
Proporción de ingresos debido a COVID	Número de ingresos hospitalarios por COVID en 7 días * 100 / Total de ingresos hospitalarios en 7 días	≤ 1 %	> 1 a ≤ 5 %	> 5 a ≤ 10 %	> 10 a ≤ 20 %	≥ 20 %	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA
Porcentaje de casos hospitalizados que ingresan en UCI	Número de casos confirmados que han ingresado en la UCI * 100 / Total de casos hospitalizados por COVID (valorada a los 7 días)	≤ 5 %	> 5 a ≤ 10 %	> 10 a ≤ 20 %	> 20 a ≤ 30 %	≥ 30 %	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES). Información de las CCAA
Letalidad en casos confirmados	Porcentaje de fallecidos por cohorte semanal (valorado a las 3 semanas del diagnóstico)	≤ 0,5 %	> 0,5 a ≤ 1 %	> 1 a ≤ 3 %	> 3 a ≤ 5 %	≥ 5 %	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES)
Tasa de mortalidad acumulada en 7 días por millón de habitantes	Casos de COVID confirmados por PCR que han fallecido en 7 días * 1.000.000 / Número de habitantes en el territorio	≤ 5	> 5 a ≤ 10	> 10 a ≤ 30	> 30 a ≤ 50	> 50	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES)
Exceso de mortalidad por todas las causas en las últimas 2 semanas*	* Se considera cualquier día de exceso de mortalidad por todas las causas identificadas en las últimas 2 semanas, que pueda estar incluido en un período de exceso de mortalidad según los criterios MoMo	≤ 1 %	> 1 a ≤ 3 %	> 3 a ≤ 13 %	> 13 a ≤ 25 %	> 25 %	Sistema de monitorización de la mortalidad diaria (MoMo)
Capacidad para el control de la transmisión							
Plazas de aislamiento o cuarentena en dispositivos no sanitarios	Plazas de aislamiento o cuarentena en dispositivos no sanitarios * 100 / Nuevos casos diagnosticados en los días 5 a 18 antes de la fecha	≤ 7 %	> 7 a ≤ 5 %	> 5 a ≤ 3 %	> 3 a ≤ 1 %	> 1 %	Necesidad de recoger *ad hoc*
Ocupación de plazas de aislamiento o cuarentena en dispositivos no sanitarios	Número de plazas de aislamiento o cuarentena en dispositivos no sanitarios ocupadas en la fecha / Número de plazas disponibles en estos dispositivos	≤ 25 %	> 25 a ≤ 50 %	> 50 a ≤ 70 %	> 70 a ≤ 90 %	> 90 %	Necesidad de recoger *ad hoc*
Proporción de casos con estudios de contactos en los primeros 3 días	Número de casos diagnosticados los últimos 3 días con contactos estudiados * 100 / Total de casos diagnosticados en los últimos 3 días	≥ 90 %	< 90 a ≥ 80 %	< 80 a ≥ 70 %	< 70 a ≥ 60 %	< 60 %	Efectividad de los sistemas de trazabilidad de contactos
Centros sociosanitarios							
Centros sociosanitarios con brotes nuevos los últimos 7 días	Centros sociosanitarios con brotes nuevos los últimos 7 días * 100 / Número de centros sociosanitarios	≤ 1 %	> 1 a ≤ 3 %	> 3 a ≤ 5 %	> 5 a ≤ 10 %	> 10 %	Información semanal de brotes, información *ad hoc*
Casos por brote en centros sociosanitarios los últimos 7 días	Número de casos confirmados de residentes / Número de brotes en centros sociosanitarios los últimos 7 días	≤ 5	> 5 a ≤ 10	> 10 a ≤ 15	> 15 a ≤ 20	> 20	Información semanal de brotes

* Pruebas para el diagnóstico de infección activa (PDIA, incluidas en estrategia diagnóstico) como PCR o pruebas de antígenos

Tabla 4. Consideraciones generales

	Nivel de alerta		
	1	2	3
	Brotes complejos o transmisión comunitaria limitada	Transmisión comunitaria sostenida con presión creciente sobre el sistema sanitario	Transmisión comunitaria descontrolada que excede capacidades sistema sanitario
Relaciones sociales y familiares	**Burbujas** en GCE **Máx. 15** personas salvo GCE **Medidas de distancia, higiene y prevención**	**Burbujas** en GCE **Máx. 10** personas salvo GCE **Permanecer en domicilio**	**Limitar al máx. contactos** fuera del GCE **Máx. 6** personas **Permanecer en domicilio** Valorar **limitación horarios apertura establecimientos** no esenciales hasta 23:00 h
	Distancia interpersonal; uso de **mascarilla** en espacios públicos; **prohibición de fumar y de comer y beber** en espacios públicos si no se mantiene distancia de seguridad; descargar **App RadarCovid**		
Movilidad	Limitar viajes no esenciales fuera de la unidad territorial		**Salir del domicilio solo lo necesario** **Valorar cierres perimetrales**
Trabajo			Acudir al trabajo de manera excepcional
	Fomentar el **teletrabajo**; **turnos escalonados**; espacios comunes se regirán por normas de cada nivel		
Transporte colectivo	Promover **transporte en bicicleta o caminando**; Aumentar **frecuencia de horarios** para **ocupación baja**; Garantizar **ventilación**; No más de **2 pasajeros por fila de asientos** en taxis y VTC, salvo GCE y sin ocupar asiento contiguo al conductor; **Evitar viajar en horas punta**		

Fuente: CISNS. Actuaciones de respuesta coordinada para el control de la transmisión del COVID-19. Actualizado a 22 de octubre de 2020[19]

de alarma, van a precisar aprobación puntual de la autoridad judicial.

Como la situación continuó empeorando el 25 de octubre el gobierno aprobó mediante RD 926/2020, el **segundo estado de alarma**, que se prorrogó por un período de 6 meses desde las 00:00 horas del 9 de noviembre de 2020 hasta las 00:00 horas del 9 de mayo de 2021. La autoridad competente es el gobierno de la nación, pero delegó la dirección en quien ostente la presidencia en cada comunidad o ciudad autónoma. Incluyó la medida del toque de queda, que ya se aplicaba en otros países como Francia, pero no incluyó el confinamiento.

«Durante el período establecido:

1. **Se limita la circulación de las personas por las vías o espacios de uso público entre las 23:00 y las 6:00 horas** excepto para: adquirir medicamentos, productos sanitarios y otros bienes de primera necesidad; asistir a centros, servicios y establecimientos sanitarios o a centros de atención veterinaria por motivos de urgencia; cumplir obligaciones laborales, profesionales, empresariales, institucionales o legales; retornar al lugar de residencia habitual tras realizar algunas de estas actividades; asistir y cuidar a mayores, menores, dependientes, personas con discapacidad o personas especialmente vulnerables; por causa de fuerza mayor o situación de necesidad o cualquier otra actividad de análoga naturaleza acreditada; repostar en gasolineras o estaciones de servicio, cuando sea necesario para la realización de las actividades previstas.

   La autoridad competente delegada podrá determinar, en su ámbito territorial, su inicio entre las 22:00 y las 00:00 horas y su fin entre las 5:00 y las 7:00 de la mañana. Su aplicación será para todo el país salvo la Comunidad Autónoma de Canarias, debido a su mejor situación epidemiológica.
2. **Se restringe la entrada y salida de personas del territorio de cada comunidad o ciudad autónoma** salvo para: asistir a centros, servicios y establecimientos sanitarios; cumplir obligaciones laborales, profesionales, empresariales, institucionales o legales; asistir a centros universitarios, docentes y educativos; retornar al lugar de residencia habitual o familiar; asistir y cuidar a mayores, menores, dependientes, personas con discapacidad o personas especialmente vulnerables; desplazarse a entidades financieras y de seguros o estaciones de repostaje en territorios limítrofes, actuaciones requeridas o urgentes ante los órganos públicos, judiciales o notariales; renovar permisos y documentación oficial, así como otros trámites administrativos inaplazables; realizar exámenes o pruebas oficiales inaplazables; causa de fuerza mayor o situación de necesidad o cualquier otra actividad de análoga naturaleza, debidamente acreditada.

19. CISNS. Actuaciones de respuesta coordinada para el control de la transmisión del COVID-19. Actualizado a 22 de octubre de 2020. https://www.lamoncloa.gob.es/serviciosdeprensa/notasprensa/sanidad14/Documents/2020/221020_ActuacionesrespuestaCOVID.pdf

Tabla 5. Medidas para situaciones de riesgo alto, medio y bajo, de acuerdo con los diferentes niveles de alerta

Situaciones que implican RIESGO ALTO (Contacto estrecho y prolongado; Espacios cerrados; Ventilación escasa o deficiente; Concurrencia de muchas personas; Actividades incompatibles con el uso de mascarilla)			
	Nivel alerta		
	1	2	3
Velatorios, entierros y ceremonias fúnebres	*Espacios cerrados*: aforo **75 % máx. 50** personas *Espacios abiertos*: Sin limitaciones	50 % (máx. 30 personas) Sin limitaciones	1/3 (máx. 10 personas) Máx. 20 personas
Otras ceremonias (bodas, bautizos...) y lugares de culto	*Ceremonias*: no >75 % de aforo en espacios cerrados (máx. 50 personas). Sin limitaciones al aire libre *Lugares de culto*: no >75 % de aforo en espacios cerrados.	No >50 % de aforo en espacios cerrados (máx. 30 personas). Sin limitaciones al aire libre No >50 % de aforo en espacios cerrados. (→ TV)	Si es posible, aplazarlas. 1/3 en espacios cerrados (máx. 10 personas). Aire libre (máx. 20 personas) 1/3 de aforo en espacios cerrados. (→ TV)
Centros sociosanitarios	Limitar salidas de residentes		
	Limitar visitas garantizando las medidas de distanciamiento e higiene y prevención	Limitar visitas garantizando las medidas de distanciamiento e higiene y prevención y bajo supervisión.	
Otros centros sociosanitarios (centros de día, centros de discapacitados, etc.)	Limitar las salidas de residentes Limitar visitas garantizando las medidas de distanciamiento físico e higiene y prevención.	Limitar las salidas de residentes Limitar visitas garantizando las medidas de distanciamiento físico e higiene y prevención y bajo supervisión Valorar la limitación de aforos	Suspender la actividad salvo necesidad justificada de mantenerla
Centros recreativos de mayores (hogares del jubilado) y de jóvenes (ludotecas, centros de ocio juvenil...)	Apertura al 75 % de su aforo interior. Actividad permitida solo en mesas garantizando distancia 2 m entre mesas Ocupación máx. 10 personas/mesa	Apertura al 50 % de su aforo interior. Actividad solo en mesas garantizando distancia 2 m entre mesas. Ocupación máx. 6 personas/mesa.	Suspender la actividad salvo necesidad justificada de mantenerla.
	Se deberá asegurar la correcta ventilación de los espacios interiores. En todo momento se hará uso de la mascarilla cuando no se esté comiendo ni bebiendo.		
ZONAS INTERIORES de establecimientos de restauración y hostelería (bares, cafeterías y restaurantes –incluidos los de los hoteles–)	Apertura al 75 % de su aforo interior. Ocupación máx. 10 personas/mesa. Garantizar distancia 2 m entre mesas	Apertura al 50 % de su aforo interior. Ocupación máx. 6 personas/mesa. Garantizar la distancia 2 m entre mesas. Prohibición de consumo en barra.	Valorar cierre zona interior establecimientos, o reducir aforos al mínimo posible. Dar servicio de recogida en local, envío a domicilio o recogida en vehículo manteniendo distancias seguridad y medidas de prevención.
	— Asegurar la correcta **ventilación** de los espacios interiores. — Uso de la mascarilla cuando no se esté comiendo ni bebiendo. — Se puede encargar comida y bebida para llevar. — Se eliminarán los servicios self-service o bufet.		
ZONAS INTERIORES de instalaciones y centros deportivos (fuera del ámbito regulado por el Consejo Superior de Deportes)	75 % aforo garantizando 2 m distancia y ventilación. Cerrados si no se puede garantizar. En actividades grupales mantendrán los límites de personas establecidos en este nivel.	50 % aforo garantizando 2 m distancia y ventilación. Cerrados si no se puede garantizar. En las actividades grupales se mantendrán los límites de personas establecidos en este nivel.	1/3 de aforo garantizando 2 m distancia y ventilación. Cerrados si no se puede garantizar. En las actividades grupales se mantendrán los límites de personas establecidos en este nivel.

	Nivel alerta		
	1	2	3
Residencias de estudiantes	Apertura zonas comunes al 75 % del aforo garantizando distancia y medidas de higiene y prevención favoreciendo uso de zonas bien ventiladas.	Apertura zonas comunes a 50 % del aforo (incluidos comedores, donde se pueden establecer turnos) y siempre garantizando distancias y medidas de higiene y prevención.	Apertura zonas comunes a 1/3 del aforo (incluidos comedores, donde se pueden establecer turnos) y siempre garantizando distancias y medidas de higiene y prevención. Prohibición de visitas.
Establecimientos como salas de bingo, casinos, salones recreativos y de juegos y locales específicos de apuestas	Apertura a un 75 % de su aforo interior. Ocupación máx. 10 personas/mesa. Garantizar distancia 2 m entre mesas.	Apertura a un 50 % de su aforo interior. Ocupación máx. 6 personas/mesa. Garantizar distancia 2 m entre mesas. Prohibición de consumo en barra.	La autoridad sanitaria deberá valorar el cierre, y en su defecto reducir los aforos al mínimo posible.
Discotecas, locales de ocio nocturno	Cierre		
Situaciones que implican RIESGO MEDIO (Situaciones que implican: Contacto controlado – Espacios cerrados bien ventilados – Espacios abiertos con concurrencia de muchas personas – Actividades compatibles con un uso continuo de mascarilla)			
Congresos, encuentros, reuniones de negocio, conferencias, seminarios y otros eventos profesionales	No podrá >75 % del aforo con máx. 50 asistentes garantizando distanciamiento e higiene y prevención. Evitar las aglomeraciones en zonas de descanso.	No podrá >50 % del aforo con máx. 30 asistentes garantizando distanciamiento e higiene y prevención. Evitar aglomeraciones en zonas descanso. Recomendar realización telemática especialmente en actividades destinadas a personal esencial	Solo de forma telemática.
Locales comerciales y prestación de servicios y mercadillos	**Locales**: aforo al 75 %. Si no es posible mantener la distancia de seguridad, se restringirá la permanencia dentro del local a 1 cliente. **Mercadillo**: 75 % de los puestos habitualmente autorizados.	Locales: aforo al 50 %. Si no es posible mantener la distancia de seguridad, se permitirá la permanencia dentro del local de 1 cliente. Mercadillo: 75 % de los puestos habitualmente autorizados, si es al aire libre.	Locales: aforo a 1/3. Si no es posible mantener la distancia de seguridad, se restringirá la permanencia dentro del local a 1 cliente. Mercadillo: 50 % de los puestos habitualmente autorizados, si es al aire libre.
	Los servicios de recogida y envío a domicilio se mantendrán operativos, siempre manteniendo las medidas de distanciamiento e higiene y prevención.		
Academias, autoescuelas, otros centros de formación no reglada (incluidas actividades promovidas por las administraciones)	75 % del aforo Podrá impartirse de un modo presencial siempre que se mantengan las medidas físicas de distanciamiento e higiene y prevención. Recomendar enseñanza telemática.	50 % del aforo. Podrá impartirse de un modo presencial siempre que se mantengan las medidas de distanciamiento e higiene y prevención. Valorar la asistencia de las personas vulnerables. Recomendar enseñanza telemática	1/3 del aforo. Podrá impartirse de un modo presencial siempre que se mantengan las medidas de distanciamiento e higiene y prevención. Suspender actividades donde asistan personas vulnerables
Hoteles, albergues turísticos y otros alojamientos	Apertura de zonas comunes: 75 % siempre garantizando las medidas físicas de distanciamiento e higiene y prevención y favoreciendo el uso de zonas bien ventiladas	Apertura de zonas comunes: 50 % siempre garantizando las medidas físicas de distanciamiento e higiene y prevención y favoreciendo el uso de zonas bien ventiladas	Apertura de zonas comunes: 1/3 del aforo siempre garantizando las medidas físicas de distanciamiento e higiene y prevención y favoreciendo el uso de zonas bien ventiladas
	Albergues turísticos: personas de diferentes grupos de convivencia no pueden pernoctar en la misma estancia.		

	Nivel alerta		
	1	2	3
Actividad física o deporte en grupo no profesional	Permitidos eventos deportivos no profesionales no federados garantizando las medidas de distancia, higiene y prevención y un aforo de público de 75 %.	Permitidos eventos deportivos no profesionales no federados garantizando las medidas de distancia, higiene y prevención y un aforo de público de 50 %.	Permitidos eventos deportivos no profesionales no federados garantizando las medidas prevención y 1/3 de aforo siempre que sea en exteriores Interior cerrado. Valorar suspensión deportes con contacto.
	Para estos eventos deportivos valorar el riesgo de acuerdo con los protocolos y procedimientos del Consejo Superior de Deportes (Protocolo de actuación para la vuelta de competiciones oficiales de ámbito estatal y carácter no profesional-Temporada 2020-2021) Se deberá garantizar en todo momento las normas de distancia física y medidas de prevención e higiene de acuerdo con el Decreto-Ley 21/2020 y normativa autonómica de aplicación. Vestuarios y duchas: control de acceso para asegurar las medidas de distancia e higiene y prevención.		
Práctica deportiva federada y profesional	Para estos eventos deportivos valorar el riesgo de acuerdo con los protocolos y procedimientos del Consejo Superior de Deportes (Protocolo básico de actuación para la vuelta a los entrenamientos y el reinicio de las competiciones federadas y profesionales). Se deberá garantizar en todo momento las normas de distancia física y medidas de prevención e higiene de acuerdo con el Decreto-Ley 21/2020		
ZONAS EXTERIORES de establecimientos de restauración y hostelería incluidos los hoteles	Grupos de clientes separados y sentados, sujetos a las condiciones de reuniones (15 personas).	Aforo del exterior al 75 % con grupos de clientes separados y sentados, sujetos a las condiciones de reuniones (10 personas).	Aforo del exterior al 75 %, con grupos de clientes separados y sentados, sujetos a las condiciones de reuniones (6 personas). Limitación admisión clientes a las 22 horas y de cierre a las 23 horas.
	Mesas con una distancia de al menos 1,5 metros entre sillas de diferentes mesas. En todo momento se hará uso de la mascarilla cuando no se esté comiendo ni bebiendo.		
Cines, teatros, auditorios, circos de carpa y espacios similares, así como locales y establecimientos destinados a actos y espectáculos culturales	Aforo máximo al 75 % siempre que se pueda mantener un asiento de distancia en la misma fila en caso de asientos fijos o 1,5 metros de separación si no hay asientos fijos, entre los distintos grupos de convivencia.		Aforo máximo al 50 %, siempre que se pueda mantener un asiento de distancia en la misma fila en caso de asientos fijos o 1,5 metros de separación si no hay asientos fijos, entre los distintos grupos de convivencia.
	Entradas numeradas. Asientos preasignados. Se recomienda no comer ni beber durante el espectáculo.		
Celebración de otros eventos culturales y de asistencia de público (en espacios cerrados y al aire libre)	Para todos los eventos culturales valorar el riesgo de acuerdo con el documento de Recomendaciones para eventos y actividades multitudinarias en el contexto de nueva normalidad por COVID-19 en España. Se deberá garantizar en todo momento las normas de distancia física y medidas de prevención e higiene de acuerdo con el Decreto-Ley 21/2020.		
Bibliotecas, archivos, museos, salas de exposiciones, monumentos y otros equipamientos culturales	Sin restricciones de aforo siempre garantizando las medidas de distanciamiento e higiene y prevención. Actividades en grupo sujetas a las condiciones de reuniones (15 personas).	Aforo máximo al 75 % para cada una de sus salas y espacios públicos. Actividades en grupo sujetas a las condiciones de reuniones (10 personas).	Aforo máximo al 50 % para cada una de sus salas y espacios públicos Actividades en grupo sujetas a las condiciones de reuniones (6 personas).

	Nivel alerta		
	1	2	3
Piscinas y playas	Distancia entre los distintos grupos de convivencia. Insistir en que se mantengan las medidas de distanciamiento e higiene y prevención.	Limitación de aforo al 75 % de piscinas. Limitaciones de acceso a las playas. Control de aforos.	Limitación de aforo al 50 % de piscinas al aire libre y a 1/3 en piscinas cerradas Acceso a playas para pasear o hacer deporte, manteniendo las medidas de distanciamiento físico e higiene y prevención. Limitación de horarios.
Situaciones que implican RIESGO BAJO (Situaciones que implican: Contacto controlado – Espacios abiertos – Buena ventilación – Concurrencia limitada y/o controlada de personas – Actividades compatibles con un uso continuo de mascarilla)			
Parques y zonas de esparcimiento al aire libre	Abiertos manteniendo las medidas de distanciamiento físico e higiene y prevención. Prohibición de consumo de alcohol y vigilancia de que se cumplen las medidas de reunión establecidas en cada fase. Recomendar el cierre nocturno de aquellas zonas que lo permitan.		
Centros educativos	Aplicar la guía de Medidas de Prevención, Higiene y Promoción de la Salud frente a COVID-19 para centros educativos en el curso 2020-2021. Aplicar las recomendaciones referidas a la comunidad universitaria para el curso 2020-2021 y a los centros educativos en cuyas instalaciones se desarrollan prácticas en enseñanzas de formación profesional Educación presencial según declaración de actuaciones coordinadas en salud pública frente al covid-19 para centros educativos durante el curso 2020-21. Los centros educativos se mantendrán abiertos durante todo el curso escolar asegurando los servicios de comedor, así como apoyo lectivo a menores con necesidades especiales o pertenecientes a familias socialmente vulnerables. En caso de brotes o transmisión descontrolada y antes de cerrar el centro educativo, se valorará educación semipresencial o bien adaptación horaria que permita una mayor limitación de contactos.		
Actividad física individual	Permitida al aire libre garantizando las medidas de distanciamiento e higiene y prevención.		

Fuente: CISNS. Actuaciones de respuesta coordinada para el control de la transmisión del COVID-19. Actualizado a 22 de octubre de 2020[20]

3. **Se limita la permanencia de grupos de personas en espacios públicos y privados a un máximo de seis personas, salvo que se trate de convivientes.**
4. **Se limita la permanencia de personas en lugares de culto**: la autoridad competente delegada correspondiente fijará aforos para las reuniones, celebraciones y encuentros religiosos atendiendo al riesgo de transmisión que pudiera resultar. Dicha limitación no podrá afectar al ejercicio privado e individual de la libertad religiosa.

Estas medidas serán eficaces en el territorio de cada comunidad o ciudad autónoma cuando la autoridad competente delegada lo determine. Cada una podrá, en su ámbito territorial, a la vista de la evolución de los indicadores sanitarios, epidemiológicos, sociales, económicos y de movilidad, modular, flexibilizar y suspender la aplicación de las medidas. La eficacia de la medida no podrá ser inferior a siete días naturales».

La curva de la segunda ola, tras alcanzar el pico el 1 de noviembre, comenzó a descender, pero se acercaba el puente de la Constitución y las navidades y de nuevo se volvieron a aflojar las medidas, incluso después de ver los comportamientos de la población en el puente de la Constitución y las compras de Navidad, nada acordes con una situación de pandemia, se permitieron, con unas cifras de incidencia muy elevadas, reuniones familiares en nochebuena, Navidad, fin de año, año nuevo y reyes. Un tren de eventos de supertransmisión que provocaron la subida exponencial de casos a principios de enero, originando la tercera ola, con pico el 15 de enero con 39.330 casos (fig. 5).

Una ola caracterizada por mayor presión hospitalaria, alcanzando más del 40 % de la ocupación de camas de UCI, y del 24 % de las camas generales. El número de fallecidos también fue muy importante, llegándose a los 909 fallecimientos diarios en un día de febrero.

El 27 de diciembre de 2020 se inició la vacunación y ya a partir de febrero de 2021 comenzaron a apreciarse sus efectos con disminución de la mortalidad en las residencias de mayores.

20. CISNS. Actuaciones de respuesta coordinada para el control de la transmisión del COVID-19. Actualizado a 22 de octubre de 2020. https://www.lamoncloa.gob.es/serviciosdeprensa/notasprensa/sanidad14/Documents/2020/221020_ActuacionesrespuestaCOVID.pdf

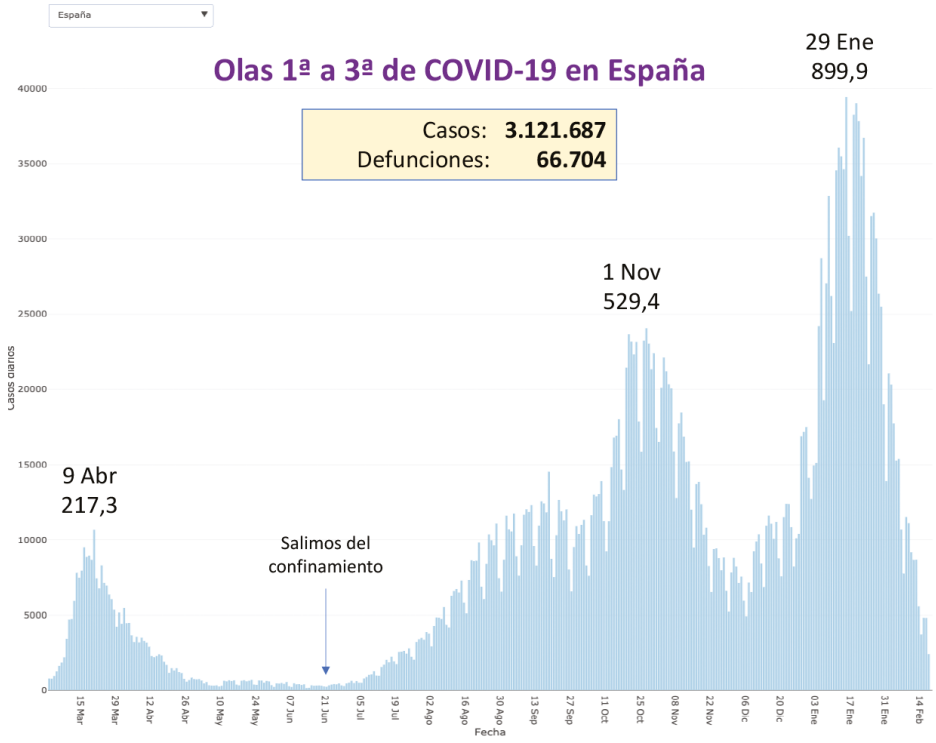


Figura 5. Curva epidémica en España. Incidencias en los picos de las tres primeras olas de primavera, verano-otoño e invierno

A principios de marzo, en la mayoría de las Comunidades Autónomas la curva de la tercera ola estancó su descenso y repuntó formando una cuarta ola aplanada que alcanzó el pico el 20 de abril con 9.637 casos. Durante esta ola la ocupación de las UCI continuó siendo muy elevada, en parte porque no disminuyera lo suficiente tras la tercera ola y también por la mayor afectación de personas más jóvenes con mejor pronóstico y estancias más largas. Esta ola tuvo menor mortalidad que las anteriores debido a que la vacunación con pauta completa alcanzaba ya al 10% de la población. Sirva de ejemplo la incidencia acumulada que en la segunda ola superó los 500 casos por 100.000 habitantes; en la tercera estuvo cerca de 900, con muchas Comunidades Autónomas superando ampliamente los 1.000, en tanto en la cuarta no pasó de 235 casos por 100.000 habitantes.

El 9 de mayo de 2021 se abandonó el segundo estado de alarma con una incidencia de 198,6 a nivel nacional, pero aún elevada en algunas Comunidades (447,56 en el País Vasco; 317,56 en Madrid; 296,13 en Navarra, y 246,94 en La Rioja)[21].

Cuando se acercaba el verano, con la cuarta ola ya por debajo de los 100 casos/100.000 habitantes, parecía que la pandemia caminaba a su fin, pero de repente se inició una nueva ola en Mallorca a donde, tras realizar la EBAU, habían ido de viaje de fin de curso, entre el 12 y el 18 de junio, cientos de estudiantes de diferentes Comunidades, provocando en un primer momento al menos 1.167 casos de COVID-19, 12 hospitalizados y 4.796 alumnos en cuarentena.

Los contagios ya habían comenzado en las fiestas celebradas durante las siete horas de travesía en los ferris que salían de Denia y Valencia rumbo a Baleares, fiestas en las que no se usaron mascarillas ni se respetaron las distancias de seguridad; así como en varios eventos de gran aforo, entre ellos algunos conciertos de reguetón celebrados en la plaza de toros de Palma el martes 15 y el domingo 19 de junio, y en las fiestas celebradas en los hoteles, cuyas imágenes mostraban la relajación general de las normas de seguridad.

El regreso de los estudiantes a sus comunidades supuso la siembra del virus por toda España transmitiéndolo a sus familiares y amigos. Enseguida en once Comunidades Autónomas se van a detectar casos asociados al viaje a Mallorca: Madrid 410; País Vasco 172; Cataluña 132; Andalucía 107; C. Valenciana 104; Galicia 102; Baleares 62; Murcia 54; Castilla-La Mancha 19; Castilla y León 12, y Aragón 10.

La no adopción rápida de medidas drásticas que redujeran los contactos interpersonales, como el toque de queda, que exigía un nuevo estado de alarma, y el cierre del ocio nocturno, propuestos inicialmente por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, unido a la continuidad de las celebraciones juveniles de

21. CCAES. Actualización n.º 370. Enfermedad por coronavirus (COVID-19), 07-05-21. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_370_COVID-19.pdf

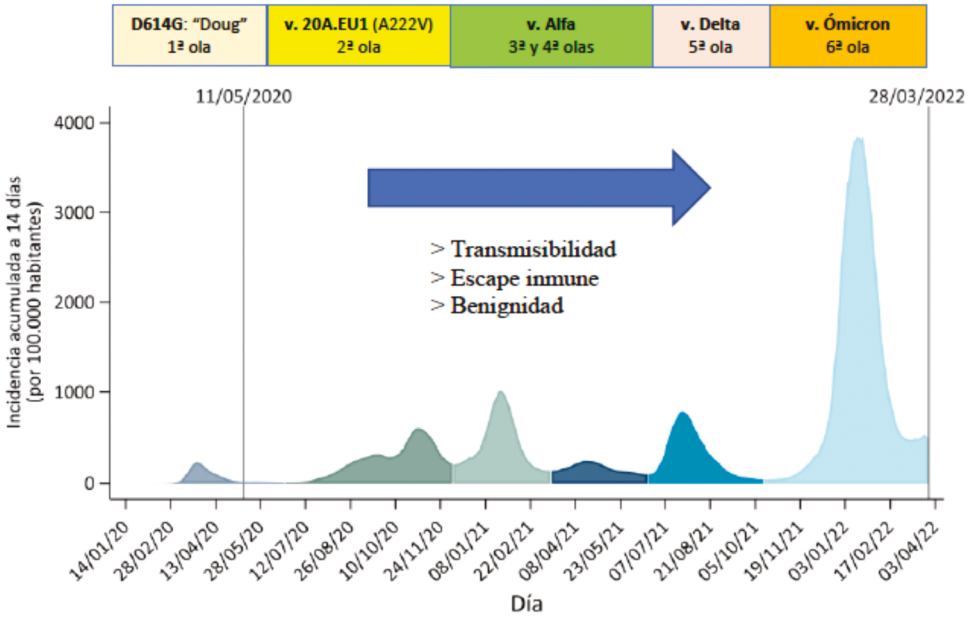


Figura 6. Variantes responsables de las seis olas pandémicas en España

fiestas y botellones en todo el país, provocó la quinta ola con una epidemiología diferente a la observada a lo largo de la pandemia, afectándose fundamentalmente los jóvenes e incluso los niños, que apenas se habían afectado a lo largo de la pandemia, y ahora eran los principales transmisores alcanzando una altísima incidencia acumulada a 14 días, de 1.875 casos, con algunas comunidades por encima de los 3.000, en los de 20 a 29 años; de 1.617 con alguna Comunidad superior a 2.000, en los de 12 a 19 años, y de 546 con alguna Comunidad superior a 900, en los de 11 y menos años. Los principales afectados van a ser personas y grupos de edad aún no vacunados o que solo habían recibido una dosis. Al inicio de la ola, muchas personas de 60 a 69 años aún no habían completado su vacunación, siendo los más vulnerables los que acababan desarrollando formas graves, que les hacían ingresar en el hospital, ir a la UCI y morir, pero los jóvenes también, aunque mucho menos, sufrieron formas graves y algunos murieron.

Al principio no se produjo sobrecarga hospitalaria, al afectarse más los jóvenes, con cuadros asintomáticos o leves, lo que no justificó la adopción de medidas más drásticas de disminución de la movilidad, aunque si se sobrecargó la atención primaria, que ya lo estaba bastante, pero al final también acabó desbordándose la atención hospitalaria en algunas Comunidades como Cataluña en donde llegó al 40 % la ocupación de camas de UCI.

El pico se alcanzó el 20 de julio de 2021 con 32.437 casos, comenzando el descenso. Alcanzándose a principios de octubre incidencias de nueva normalidad, lo que hizo pensar, una vez más, que la pandemia podía estar terminando, y van tres veces, pero en la segunda quincena de noviembre el número de casos comenzó a aumentar, al principio lentamente, incrementando su velocidad a partir de la segunda semana de diciembre con un crecimiento casi vertical produciendo la 6.ª ola, la de mayor incidencia de la pandemia, caracterizada por una gran transmisibilidad y elevada benignidad (>95 % de los casos asintomáticos o leves) que alcanzó el pico el 10 de enero de 2022 con 151.230 casos, iniciando a partir de entonces el descenso.

El elevado número de casos diarios sobrepasó la capacidad de los sistemas de vigilancia epidemiológica para llevar a cabo el diagnóstico de los casos y el rastreo de sus contactos para someterlos a aislamiento y cuarentena, así como el seguimiento de los positivos por parte de Atención Primaria, lo que, por otra parte, tenía ahora poco sentido pues la gran mayoría eran asintomáticos o casos leves que no precisaban atención médica, lo que llevó a dar el paso a la fase de mitigación a finales de marzo.

En los sucesivos períodos epidémicos, las variantes fueron cada vez más transmisibles; su período de incubación se fue reduciendo de 5-7 días la alfa, a 4-5 días la delta y a 2-3 días la ómicron; teniendo cada vez mayor escape tanto de la inmunidad de las vacunas como de la adquirida por infecciones anteriores, y produciendo cada vez con mayor frecuencia cuadros clínicos más benignos (fig. 6).

La elevada transmisibilidad de la variante ómicron y su mayor escape inmune, provocó un número tan elevado de casos diarios (151.230 en el pico de la ola, el 10 de enero de 2022) que ocasionaron tal presión sobre los sistemas de salud pública y de Atención Primaria que imposibilitaron continuar con la vigilancia epidemiológica y el rastreo de los contactos de los casos (un promedio de 5 por caso) tal como se venía haciendo, así como

con el mantenimiento de las llamadas diarias de seguimiento de los positivos por parte del personal sanitario de Atención Primaria, lo que por otra parte, tampoco tenía ya mucho sentido dada la benignidad de los casos (más del 95 % asintomáticos o leves), debido a la mayor benignidad de las nuevas variantes, al elevado porcentaje de población vacunada (más del 92 % de la población española mayor de 12 años ya había recibido la pauta vacunal completa) y al también elevado número de los que habían pasado la infección, lo que nos llevaba a considerar que la mayoría de la población de España estaba protegida frente a la COVID-19 grave. Protección que se había mantenido incluso frente a una variante como la ómicron, lo suficientemente diferente a las anteriores desde el punto de vista antigénico como para producir altísimas incidencias en población con inmunidad previa.

Todo esto motivó el cambio de fase, que supuso un punto de inflexión importante en la pandemia, dejando atrás la fase aguda de contención, para pasar a la de mitigación, centrada en proteger a los vulnerables con intervenciones tanto farmacológicas (dosis de refuerzo de vacuna, tratamientos preventivos con Evusheld y acceso temprano a tratamientos antivirales como Paxlovid), como no farmacológicas (mascarilla FFP2, higiene de manos, distancia, ventilación...), y a que la población aprenda a convivir con el virus. Una decisión de gestión de riesgos, determinando que riesgos residuales son aceptables para la sociedad teniendo en cuenta la disminución observada en su gravedad.

2. FASE DE MITIGACIÓN

En esta fase, la vigilancia epidemiológica[22] se centró en los ámbitos y grupos vulnerables y en los casos graves que pudieran necesitar atención hospitalaria; reforzando la capacidad de detección de las variantes de preocupación e interés, dejando abierta la posibilidad de incorporar sistemas complementarios como la detección del SARS-CoV-2 en aguas residuales, o el seguimiento de las incapacidades laborales temporales. Paralelamente se reforzó el desarrollo de los sistemas de vigilancia centinela de virus respiratorios incluyendo al SARS-CoV-2, que será la base de la futura vigilancia epidemiológica de las infecciones respiratorias agudas; se mantuvo y mejoró la información proporcionada por los laboratorios de microbiología, en cuanto a la realización de pruebas diagnósticas (SERLAB); el seguimiento de los casos con clínica compatible a partir de los registros de Atención Primaria, y la información facilitada por los hospitales sobre la ocupación de camas COVID, tanto de hospitalización general como de UCI[23]. Toda esta información debía permitir la evaluación de algunos indicadores (tabla 6) que facilitasen el seguimiento adecuado de la situación epidemiológica a la vez que favorecían adaptar y flexibilizar las medidas de control. Los umbrales de los niveles de riesgo se revisarían periódicamente de acuerdo con la evolución epidemiológica de la pandemia.

También cambió la estrategia de realización de pruebas diagnósticas de infección activa (PDIA) que ahora tan solo se realizarían a personas con síntomas compatibles con COVID-19 grave o factores de vulnerabilidad que pudiesen beneficiarse de un tratamiento temprano, y a aquellas que tuviesen contacto con poblaciones vulnerables, como trabajadores en centros sanitarios asistenciales y sociosanitarios. A partir de ahora solo se indicará la realización de una PDIA en las personas con clínica compatible que cumplan alguno de los siguientes criterios:

- *Criterios de vulnerabilidad*: 60 o más años, inmunodeprimidos por causa intrínseca o extrínseca (receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos o CAR-T, en los dos años tras el trasplante/tratamiento, en tratamiento inmunosupresor o que tengan una enfermedad del injerto contra el huésped, independientemente del tiempo desde el trasplante; receptores con menos de dos años de un trasplante de órgano sólido o con tratamiento inmunosupresor para eventos de rechazo; inmunodeficiencias primarias combinadas y de células B en las que se haya demostrado ausencia de respuesta vacunal; personas que han recibido en los tres meses anteriores, seis meses en caso de rituximab, fármacos anti CD20 o belimumab; Síndrome de Down de edad superior a los 40 años), y embarazadas.
- *Relación con ámbitos vulnerables*: Personas que residen, acuden, están ingresadas o trabajan en ámbitos vulnerables (centros sanitarios asistenciales, centros sociosanitarios y centros de día, centros penitenciarios y otros centros con personas institucionalizadas), así como trabajadores que prestan apoyo y cuidado a personas vulnerables.
- *Presentar un cuadro de infección respiratoria aguda de vías bajas que requiera ingreso hospitalario* (preferiblemente diagnosticado por PCR).
- *Que se tenga constancia de que haya estado en los últimos 14 días en una región en la que esté circulando una variante de interés o de preocupación que no haya mostrado circulación comunitaria en nuestro territorio, y colectivos de población migrante de reciente llegada a España.*

22. Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19 (23 de marzo de 2022). https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Nueva_estrategia_vigilancia_y_control.pdf

Tabla 6. Indicadores para la evaluación del riesgo

Indicadores		Fórmula de cálculo	Valoración de riesgo					Información
			Circulación controlada	Bajo	Medio	Alto	Muy alto	
Evaluación del nivel de transmisión								
T2	Incidencia acumulada de casos con 60 o más años diagnosticados en 14 días[1]	Casos ≥ 60 años confirmados (por fecha de diagnóstico) en 14 días * 100.000 / número de habitantes ≥ 60 años	≤ 250	> 250 a ≤ 500	> 500 a ≤ 1500	> 1500 a ≤ 2500	> 2500	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES)
T4	Incidencia acumulada de casos con 60 o más años diagnosticados en 7 días[1]	Casos ≥ 60 años confirmados (por fecha de diagnóstico) en 7 días * 100.000 / número de habitantes ≥ 60 años	≤ 100	> 100 a ≤ 250	> 250 a ≤ 750	> 750 a ≤ 1250	> 1250	Declaración individualizada obligatoria (SIVIES)
Nivel de utilización de servicios asistenciales por COVID-19								
A1	Ocupación de camas de hospitalización por casos de COVID-19[2]	Número de camas de hospitalización ocupadas por casos COVID / Número total de camas de hospitalización en funcionamiento	≤ 2 %	> 2 % a ≤ 5 %	> 5 % a ≤ 10 %	> 10 % a ≤ 15 %	> 15 %	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA
A1'	Tasa de nuevas hospitalizaciones por COVID, por 100.000 habitantes en 7 días	Número de nuevos ingresos hospitalarios por COVID en 7 días * 100.000 / Número de habitantes en el territorio	≤ 5	> 5 a ≤ 15	> 15 a ≤ 30	> 30 a ≤ 50	> 50	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA
A1''	Tasa de ocupación hospitalaria por 100.000 habitantes	Número de camas de hospitalización ocupadas por casos de COVID * 100.000 / Número de habitantes en el territorio	≤ 10	> 10 a ≤ 20	> 20 a ≤ 30	> 30 a ≤ 40	> 40	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA
A2	Ocupación de camas de cuidados críticos por casos de COVID-19[2]	Número de camas de cuidados críticos ocupadas por casos COVID / Número total de camas de cuidados críticos totales en funcionamiento	≤ 5 %	> 5 % a ≤ 10 %	> 10 % a ≤ 15 %	> 15 % a ≤ 25 %	> 25 %	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA
A2'	Tasa de nuevas hospitalizaciones en UCI por COVID, por 100.000 habitantes en 7 días	Número de nuevos ingresos en UCI por COVID en 7 días * 100.000 / Número de habitantes en el territorio	≤ 0,5	> 0,5 a ≤ 1,5	> 1,5 a ≤ 2,5	> 2,5 a ≤ 3	> 3	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA
A2''	Tasa de ocupación UCI por 100.000 habitantes	Número de camas de UCI ocupadas por casos de COVID * 100.000 / Número de habitantes en el territorio	≤ 1	> 1 a ≤ 2	> 2 a ≤ 4	> 4 a ≤ 6	> 6	Declaración al Ministerio de Sanidad por las CCAA

1. Estas IA deberán calcularse con datos consolidados, sustrayendo los días en los que dicha consolidación se considere insuficiente. Para la fecha de diagnóstico se utilizará la fecha del resultado positivo de la PDIA.
2. La Unidad Territorial para este indicador será la provincia, isla o comunidad autónoma según se establezca en cada territorio. Para el cálculo de camas en funcionamiento se tendrán en cuenta exclusivamente las camas de hospitalización y UCI estructurales y operativas para uso inmediato por pacientes COVID-19 en el momento de la evaluación tal y como se comunican al Ministerio según la Resolución de 19 de junio de 2020 por la que se establece la información sobre capacidad asistencial y de necesidades de recursos materiales del sistema sanitario.

Las personas que presenten síntomas leves y que no cumplan criterios de indicación de realización de una PDIA deben extremar las precauciones y reducir todo lo posible las interacciones sociales utilizando de forma constante la mascarilla y manteniendo una adecuada higiene de manos durante los 10 días posteriores al inicio de síntomas. Se evitará especialmente el contacto con personas vulnerables y la participación en eventos multitudinarios. Siempre que sea posible y en caso de que no sea susceptible de una incapacidad temporal por su sintomatología, se recomienda el teletrabajo.

Se limita también la indicación de aislamientos a entornos muy concretos, y no se proponen cuarentenas en los contactos estrechos, que deben extremar las precauciones y reducir en todo lo posible las interacciones sociales durante los 10 días posteriores a la última exposición, utilizando de forma constante la mascarilla y manteniendo una adecuada higiene de manos, evitando especialmente el contacto con personas vulnerables.

Tampoco se considera ya necesario, de manera general, la realización de cribados en centros sanitarios previos al ingreso o a determinadas actuaciones asistenciales. En cualquier caso, los centros hospitalarios podrán considerar el uso de cribados en situaciones específicas y con el objetivo de proteger a los pacientes vulnerables, a criterio de los responsables de control de la infección.

En las residencias para mayores y otros centros sociosanitarios, ante la aparición de un caso con clínica compatible en un residente se procederá a su aislamiento hasta la obtención del resultado de la PCR. Si el resultado es positivo se mantendrá el aislamiento, y se estudiaran sus contactos estrechos. La duración del aislamiento será de 5 días desde el inicio de síntomas o desde el diagnóstico en los casos asintomáticos, finalizándolo siempre que hayan transcurrido 24 horas tras la resolución de los síntomas. En los casos graves e inmunodeprimidos el período de aislamiento se adaptará en función del curso clínico. El personal del centro sociosanitario en el que se confirme la infección no acudirá a su centro de trabajo durante los primeros 5 días desde el inicio de síntomas o de la fecha de diagnóstico en caso de asintomáticos. Pasado este tiempo, y siempre que hayan transcurrido 24 horas de la desaparición de fiebre o mejoría de los síntomas, al personal que tiene contacto directo con los residentes se le realizará una prueba de antígeno y si el resultado es negativo podrá volver a incorporarse a su lugar de trabajo. En cualquier caso, a partir del séptimo día desde el inicio de síntomas o desde la prueba positiva en caso de personas asintomáticas, y siempre que esté asintomática o con síntomas residuales, se podrá incorporar a su puesto de trabajo empleando las medidas preventivas necesarias según la valoración del servicio de prevención de riesgos laborales. El resto del personal se podrá incorporar a partir del quinto día si han desaparecido los síntomas. En este ámbito se aplicarán medidas de intervención y control específicas ante la detección de un solo caso en residentes o de tres casos en trabajadores.

Todo este conjunto de medidas, se pusieron en marcha el 28 de marzo de 2022[23].

De este cambio en la vigilancia epidemiológica, se quejó la OMS, que nos cegaba mucho sobre la evolución de la incidencia de la infección, pero era necesario normalizar cuanto antes el funcionamiento del SNS, para atender muchas patologías más graves que no lo habían sido durante esos dos años largos de pandemia. Además, no tenía ningún sentido todo el esfuerzo que se estaba realizando desde Atención Primaria llamando diariamente a todos los casos cuando estos eran asintomáticos o leves, pues podían perfectamente auto cuidarse como se hace habitualmente todos los años con los casos leves de gripe en personas no vulnerables, de ahí el uso que se hizo del término gripalización, para referirse a estos autocuidados a los que la población está acostumbrada.

Por otra parte, dada la benignidad de la mayoría de los cuadros clínicos, era necesario que todo el conjunto de la población aprendiese a convivir con el virus para poder ir normalizando la vida dejando atrás la fase aguda de la pandemia.

El mantenimiento de este cambio de estrategia se condicionó a que no se incrementase la presión asistencial (porcentaje de camas generales y de camas de UCI ocupadas por pacientes COVID-19), o un cambio en la situación epidemiológica que requiriese restablecer medidas de vigilancia y control. Por tanto, durante esta fase de mitigación debían conservarse las estructuras extraordinarias de vigilancia y control desarrolladas durante la pandemia y garantizar que se podrían reactivar por parte de las CCAA y la administración general del Estado en caso necesario.

3. EVOLUCIÓN DE LA PANDEMIA EN LA FASE DE MITIGACIÓN

Al principio de la fase de mitigación se produjeron dos olas, la primera con pico el 11 de mayo de 2022, y la segunda el 10 de julio, produciéndose a partir de entonces un descenso con pequeñas oscilaciones con mantenimiento de un nivel bajo de casos hasta la fase de endemia.

23. Estrategia de detección precoz, vigilancia y control de COVID-19 (23 de marzo de 2022). https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Nueva_estrategia_vigilancia_y_control.pdf

Tabla 7. Primera ola de la fase de mitigación. Indicadores de incidencia y de capacidad asistencial de España

Fecha	España			
	IA_{14}	IA_{7}	% Camas	% Camas UCI
30/03/2022	459,27	202,92	3,34	4,62
03/04/2022	426,15	178,77	3,46	4,41
10/04/2022	435,42	224,00	3,87	4,07
19/04/2022	505,86	256,92	4,59	3,84
22/04/2022	555,47	260,83	4,94	3,76
24/04/2022	608,16	330,81	5,22	4,05
27/04/2022	676,43	382,15	5,12	3,66
01/05/2022	790,28	420,65	5,56	4,02
04/05/2022	813,22	391,17	5,53	4,04
08/05/2022	843,24	396,24	5,89	3,96
11/05/2022	**856,56**	**422,48**	**5,80**	**4,07**
15/05/2022	846,55	410,23	6,10	4,20
18/05/2022	848,62	383,08	5,94	4,07
22/05/2022	800,47	349,76	6,12	4,07
25/05/2022	728,22	312,52	5,64	4,25
29/05/2022	663,22	282,22	5,53	3,98
01/06/2022	617,92	275,60	5,25	3,65
05/06/2022	586,71	278,39	5,48	3,62
08/06/2022	578,39	278,50	5,20	3,65

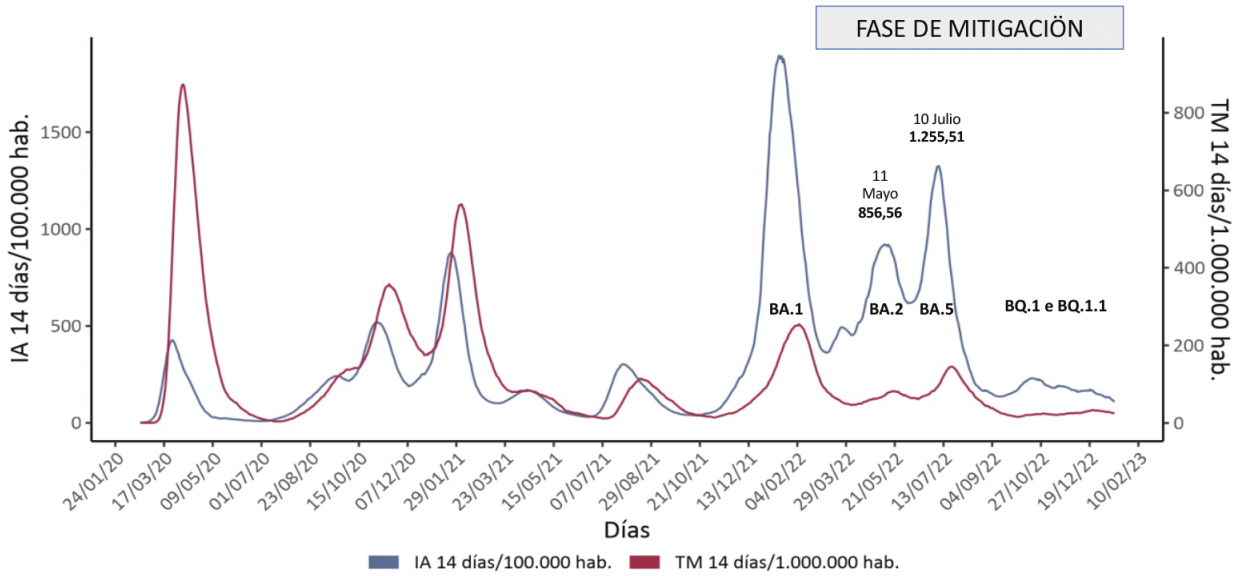
Primera ola: Se inició a principios de abril alcanzando el pico a nivel nacional el 11 de mayo, descendiendo a partir de entonces (tabla 7 y fig. 7). Se debió a la sustitución del linaje BA.1 de ómicron por el BA.2, que fue predominante desde marzo hasta junio, junto con la mayor interacción social sin medidas de protección.

Segunda ola: A partir del 12 de junio, sin haber llegado la incidencia acumulada a 14 días a los niveles basales del inicio de la fase de mitigación, comenzó la segunda ola con un incremento rápido de casos debido a la sustitución, en nuestro país y otros países europeos, del linaje BA.2 por el BA.5. Linaje que había sido detectado en enero y febrero en Sudáfrica, y que era entonces el dominante en Portugal. En un primer momento las comunidades más afectadas fueron Galicia, Extremadura y Baleares, extendiéndose rápidamente por todo el país. En la semana 28 (11 a 17 de julio) los linajes BA.4 y sobre todo BA.5 eran los dominantes en España, oscilando entre las diversas CCAA entre el 54 % y 96 % de los aislamientos en los cribados aleatorios por PCR, y para el linaje BA.2 entre el 1,6 % y 15,6 %[24].

A su rápida extensión, además de su mayor transmisibilidad, también contribuyó el importante aumento de los contactos interpersonales por las vacaciones, la celebración de festivales, fiestas y reuniones familiares y de amigos. Esos incrementos de casos eran esperables y aunque también aumentaron en un principio los ingresos en los hospitales, en ningún momento se produjo una sobrecarga hospitalaria importante, además algo más de la mitad de los ingresos eran con COVID-19 no por COVID-19.

El 10 de julio esta segunda ola de la fase de mitigación alcanzó el pico (1.255,51) y comenzó a descender

24. CCAES. Actualización de la situación epidemiológica de las variantes SARS-CoV-2 en España, 27 de julio de 2022. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/COVID19_Actualizacion_variantes_20220727.pdf



Fuente: CNE. ISCIII. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Figura 7. Evolución da tasa de incidencia acumulada (azul) y la tasa de mortalidad acumulada (rojo) a 14 días en España, en la que se aprecian las dos olas de la fase de mitigación con sus picos y las variantes responsables. Casos de COVID-19 notificados a la RENAVE desde el inicio de la pandemia en personas de 60 o más años

(tabla 8 y fig. 7), llegando el 18 de septiembre a incidencias acumuladas a 14 días (129,44) similares a las previas a la sexta ola, y porcentajes de ocupación de camas 2,09 % en planta y 1,84 % en UCI, correspondientes a una situación de circulación controlada. A partir de entonces, la incidencia acumulada a 14 días va a tener ligeras oscilaciones, subiendo poco a poco con un pequeño pico el 19 de octubre (221,58), no variando apenas la ocupación de camas de agudos, 2,72 %, y de UCI, 2,00 %, nuevo descenso y vuelta a aumentar ligeramente el 16 de noviembre, con ocupaciones también ligeramente superiores de camas de agudos (3,07 %) y de UCI (2,32 %), siendo los hospitalizados por COVID-19 en agudos el 45,2 % y en la UCI el 47,1 %.

En cuanto a la clínica no hay diferencias importantes con la de otros linajes de ómicron. En general los cuadros son leves, salvo en personas inmunodeprimidas y no vacunadas y personas mayores con muchas vulnerabilidades, que pueden sufrir cuadros más graves. Produce generalmente un cuadro de tipo catarral con congestión nasal, tos, dolor de garganta, fatiga, cefalea, y dolores musculares y cansancio.

4. FASE DE ENDEMIA

La incidencia continuó descendiendo con oscilaciones, manteniéndose estable en valores bajos a lo largo del tiempo (tabla 9), lo que motivó que, tras la celebración el 4 de mayo de 2023 de la decimoquinta reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (2005) sobre la pandemia de enfermedad por coronavirus (COVID-19), y en base a su asesoramiento, el director general de la OMS declarase, el 5 de mayo, que la COVID-19 era ahora un problema de salud establecido y persistente que ya no constituía una emergencia de salud pública de importancia internacional, poniendo de esta manera fin a la pandemia.

Pero advirtió que el virus vino para quedarse, y por tanto los países debían integrar las actividades de vigilancia y respuesta a la COVID-19 en sus programas de salud regulares, realizando las siguientes recomendaciones temporales a todos los Estados[25]:

a) Mantener la capacidad nacional adquirida y prepararse para futuros eventos epidémicos.
b) Integrar la vacunación contra la COVID-19 en los programas de vacunación a lo largo de la vida en los grupos de alto riesgo.
c) Reunir información procedente de diversas fuentes de datos de vigilancia sobre agentes patógenos respiratorios para permitir un conocimiento exhaustivo de la situación, manteniendo la notificación a la OMS de los datos sobre mortalidad y morbilidad, así como vigilancia de variantes, con una combinación de poblaciones centinela representativas, vigilancia basada en eventos, vigilancia de las aguas residuales, serovigilancia y vigilancia de poblaciones animales seleccionadas de las que se sepa que presentan riesgo de infección por SARS-CoV-2. Los Estados deben

25. https://www.who.int/es/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic

Tabla 8. Segunda ola de la fase de mitigación. Indicadores de incidencia y de capacidad asistencial de España

Fecha	España			
	IA_{14}	IA_{7}	% Camas	% Camas UCI
08/06/2022	578,39	278,50	5,20	3,65
12/06/2022	589,82	284,85	5,50	3,85
16/06/2022	612,39	302,24	5,51	3,82
19/06/2022	653,25	340,83	6,35	4,07
22/06/2022	755,71	419,70	6,67	4,38
26/06/2022	841,27	468,37	7,79	4,93
29/06/2022	996,25	539,33	8,37	5,06
03/07/2022	1.135,30	717,53	9,56	5,73
06/07/2022	1.225,28	632,22	9,95	5,77
10/07/2022	**1.255,51**	**582,74**	**10,58**	**5,72**
13/07/2022	1.158,54	477,53	9,70	5,88
17/07/2022	1.018,00	391,99	9,64	6,30
20/07/2022	858,24	326,33	8,74	5,91
24/07/2022	694,73	274,28	8,23	5,97
27/07/2022	558,27	217,53	7,09	5,34
31/07/2022	475,95	183,37	6,64	4,96
03/08/2022	395,83	159,91	5,70	4,59
07/08/2022	336,05	134,44	5,16	4,60
10/08/2022	283,38	107,88	4,62	4,35
14/08/2022	246,45	99,76	4,40	4,20
17/08/2022	195,17	74,74	3,89	3,60
21/08/2022	176,52	71,16	3,53	3,24
24/08/2022	161,99	76,46	3,06	2,91
28/08/2022	153,05	72,93	2,93	2,70
31/08/2022	153,87	69,30	2,58	2,46
04/09/2022	149,93	69,00	2,52	2,74
07/09/2022	137,39	61,45	2,27	2,13
11/09/2022	130,17	58,23	2,20	1,98

Fuente: Elaboración propia con datos del Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias

aprovechar el Sistema Mundial de Vigilancia y Respuesta a la Gripe y apoyar la creación de una Red Mundial de Laboratorios de Coronavirus de la OMS (CoViNet).

d) Prepararse para que se autoricen las vacunas, los medios de diagnóstico y los tratamientos dentro de los marcos regulatorios nacionales, con objeto de garantizar su disponibilidad y suministro a largo plazo.
e) Mantener la colaboración con las comunidades y sus líderes para lograr programas sólidos, resilientes e integradores de comunicación de riesgos y participación de la comunidad y de gestión de la infodemia.
f) Seguir levantando las medidas de salud relacionadas con los viajes internacionales por la COVID-19, basándose en las evaluaciones de riesgos, y no exigir ninguna prueba de vacunación contra la COVID-19 como requisito previo para los viajes internacionales.
g) Continuar apoyando la investigación para mejorar las vacunas que reducen la transmisión y tienen una amplia aplicabilidad; comprender el espectro completo, la incidencia y el impacto de la afección posterior a la COVID-19 y la evolución del SARS-CoV-2 en poblaciones inmunodeprimidas; y crear vías asistenciales integradas que resulten adecuadas.

Tabla 9. Indicadores de incidencia de COVID-19 y de capacidad asistencial en España.
Desde el 14 de septiembre de 2022 al 28 de junio de 2023

Fecha	IA_{14}	IA_{7}	% Camas	% UCI
14/09/2022	129,82	62,70	2,08	1,72
18/09/2022	129,44	64,48	2,09	1,84
21/09/2022	136,26	67,92	1,86	1,52
25/09/2022	141,78	70,21	1,92	1,65
28/09/2022	149,84	75,06	1,88	1,64
02/10/2022	155,55	78,49	2,06	1,63
05/10/2022	168,41	86,32	2,22	1,48
12/10/2022	195,61	99,85	2,69	2,00
19/10/2022	221,58	112,24	2,72	2,00
26/10/2022	220,14	98,98	2,70	2,15
02/11/2022	185,55	78,92	2,73	2,23
09/11/2022	172,71	84,70	2,73	2,40
16/11/2022	181,80	90,56	3,07	2,32
23/11/2022	181,59	81,39	3,04	2,45
30/11/2022	165,38	72,09	3,09	2,60
07/12/2022	158,04	73,98	3,35	2,76
14/12/2022	156,59	77,34	3,54	3,05
21/12/2022	160,84	75,55	3,28	2,65
28/12/2022	141,47	60,48	3,02	2,71
03/01/2023	129,40	63,75	3,02	2,82
11/01/2023	124,52	52,65	2,79	2,52
18/01/2023	97,64	37,85	2,32	2,50
25/01/2023	67,58	26,02	1,87	2,01
01/02/2023	50,76	22,46	1,64	1,70
08/02/2023	51,61	25,16	1,50	1,26
15//02/2023	53,58	25,79	1,46	1,33
22/02/2023	56,30	27,53	1,50	1,07
01/03/2023	58,79	28,26	1,46	0,95
08/03/2023	63,64	32,39	1,60	1,07
15/03/2023	72,05	35,63	1,71	1,03
22/03/2023	69,76	30,42	1,61	1,16
29/03/2023	68,99	34,44	1,64	1,16
12/04/2023	70,45	34,43	1,73	1,31
19/04/2023	89,49	49,07	1,87	1,20
03/05/2023	93,96	41,85	2,02	1,24
17/05/2023	98,31	44,77	1,90	1,19
31/05/2023	97,97	43,76	1,92	1,77
14/06/2023	66,52	26,39	1,42	1,12
28/06/2023	41,56	16,92	1,06	0,99

Fuente: Elaboración propia con datos del Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias

5. FIN DE LA PANDEMIA EN ESPAÑA

En España la declaración de la finalización de la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19 se retrasó hasta el 5 de julio de 2023, con la publicación de la Orden SND/726/2023 con el Acuerdo del Consejo de ministros de 4 de julio de 2023. Entonces, a 28 de junio de 2023, las incidencias acumuladas a 14 días (41,56) y a 7 días (16,92) en mayores de 60 años, no diferían mucho de las del 8 de febrero (51,61 y 25,16)[26], cuando decayera la obligatoriedad del uso de mascarilla en el transporte. La mayoría de los ingresos en el hospital hacía ya mucho tiempo que eran en su mayoría con COVID-19 y no por COVID-19. Como ejemplo, el 16 de noviembre de 2022[27], los ingresados por COVID-19 en camas de agudos eran el 45,2 %, y en UCI el 47,1 %.

En nuestro país, cuando se abandonaron las medidas restrictivas, hacía ya tiempo que la situación epidemiológica no era de pandemia. El virus había ido perdiendo genio epidémico, siendo la variante ómicron y sus sucesivos linajes y sublinajes cada vez más transmisibles y benignos, y la población, gracias a las vacunas, y por haber pasado en su mayoría la infección, había desarrollado una sólida inmunidad (tabla 10).

Tabla 10. Situación vacunal frente al COVID-19 de la población española a 18 de enero de 2023

Grupos de edad	1ª dosis	Pauta completa	Dosis de recuerdo	
			1ª	2ª
5-11	57,2	47,4		
12-19	91,4	95,8	32,87	
20-29	86,4	84,7	44,68	
30-39	88,9	87,6	50,76	
40-49	92,3	91,8	66,00	
50-59	93,7	93,7	80,77	
60-60	94,5	94,2	94,72	43,84
70-79	97,1	96,8	93,72	63,82
>80	100	100		74,56
<12	92,8	92,6		

A partir de ese momento se implantó una nueva estrategia de vigilancia y control de la COVID-19 en Atención Primaria (IRAs) y en hospitales (IRAG) mediante el SIVIRA[28] (Sistema de Vigilancia de Infecciones Respiratorias Agudas: gripe, COVID-19 y VRS, así como de cualquier otro virus respiratorio que pueda ser de interés o emerger en un futuro). Sus informes con los resultados de la vigilancia se publican semanalmente en la página Web del ISCIII[29].

Las medidas de prevención y control, adaptadas a la situación, continuarán dirigiéndose, fundamentalmente, a la población más vulnerable, como son las personas que viven en Centros Residenciales (a tal fin, la Ponencia de Alertas y de Planes de Preparación y Respuesta elaboró una *Guía de actuación para la prevención y el control de brotes de infecciones respiratorias agudas en centros residenciales de personas vulnerables*)[30], y en centros sanitarios en los que, para el control de la transmisión de la COVID-19, se considera adecuado la aplicación de las precauciones estándar para el control de la trasmisión de virus respiratorios, reforzando el uso de mascarilla en determinados contextos y situaciones.

Con respecto a la población general, ya no está indicado el aislamiento de casos confirmados ni la identificación y cuarentena de contactos estrechos, pero se recomienda que las personas con sintomatología compatible con una IRA sigan las medidas de la etiqueta respiratoria (al toser o estornudar, cubrirse la boca y la nariz con el codo flexionado, usar pañuelos desechables, y tirarlos tras su uso, evitar tocarse los ojos, la nariz y la boca) incluyendo el uso de mascarilla, especialmente cuando tengan interacción con personas vulnerables. Así mismo, a las personas especialmente vulnerables se les recomienda el uso de mascarilla en ámbitos de riesgo como en eventos de concentración masiva de personas[31].

6. EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD EN LA FASE DE ENDEMIA

El SARS-CoV-2, a diferencia del SARS-CoV-1 no desapareció y ha continuado circulando en la comunidad con

26. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_658_COVID-19.pdf
27. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Actualización n.º 646. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 18.11.2022. https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_646_COVID-19.pdf
28. https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/Nuevo_marco_estrategico_COVID-19_05072023.pdf
29. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Paginas/VIGILANCIA-CENTINELA-DE-INFECCION-RESPIRATORIA-AGUDA.aspx
30. https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/Guia_actuacion_IRA_centros_residenciales_2023.07.05.pdf
31. https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/Nuevo_marco_estrategico_COVID-19_05072023.pdf

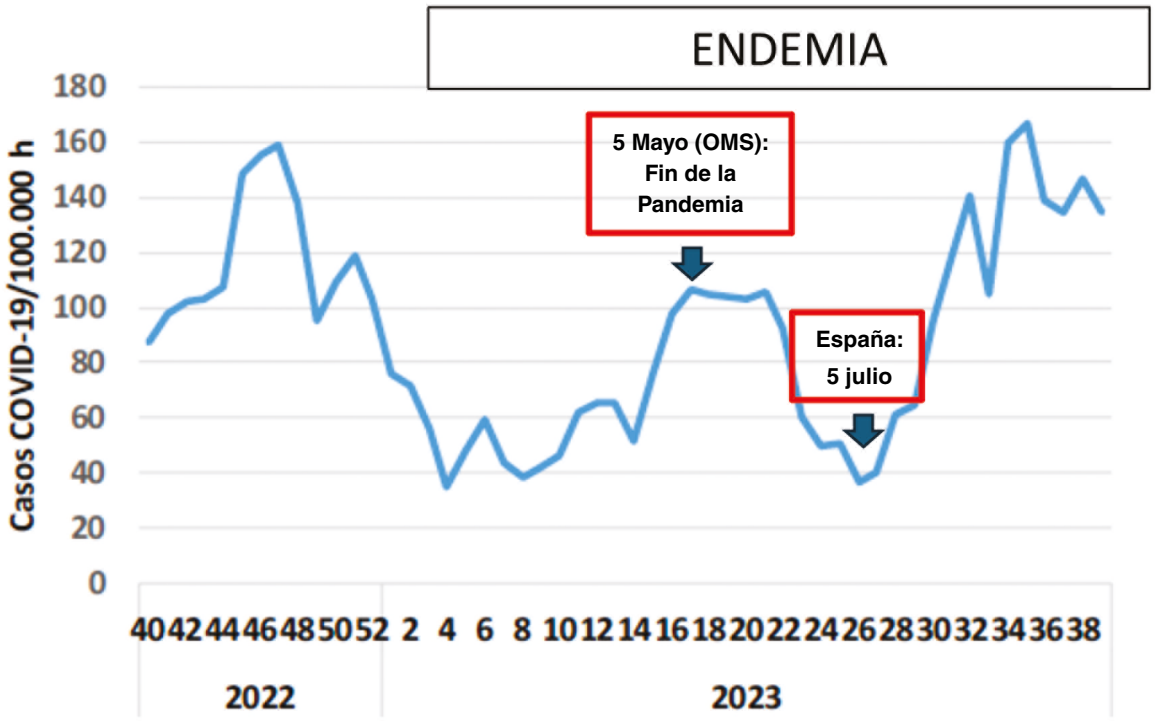


Figura 8. Evolución de la tasa estimada de casos de COVID-19/100.000 habitantes en España durante el año epidemiológico de IRAs 2022/2023 en el que se aprecia la evolución de la incidencia de la enfermedad antes y después de las declaraciones del fin de la pandemia. Fuente: SIVIRA Semana 39/2023 (del 25 de septiembre al 1 octubre de 2023) N.º 151, 5 de octubre de 2023[32]

incidencias bajas, generalmente por debajo de 100 casos/100.000 habitantes e incluso durante mucho tiempo alrededor de 50 casos/100.000 habitantes, llegando a alcanzar incidencias de 38,2 casos/100.000 habitantes en la semana 24/2023 (del 12 al 18 de junio), y tasas de hospitalización por debajo de 1 caso/100.000 habitantes, produciendo en la mayoría de los infectados cuadros clínicos similares a un catarro.

A mediados de julio y sobre todo en agosto (fig. 8), se produjo un incremento importante de casos de COVID-19, no de su gravedad, debido de una parte a la disminución de los anticuerpos circulantes en la población, dado el tiempo transcurrido desde la última dosis de vacuna, y de otra a la gran movilidad (unos 20 millones de personas se habían desplazado a otros lugares por las vacaciones) con incremento de contactos interpersonales entre personas de muy diversas procedencias, que podían ser portadoras de diferentes sublinajes de la variante ómicron frente a los que otros fueran más susceptibles, o incluso a que ya estuviese circulando el nuevo sublinaje EG.5, más contagioso, pero no más grave, descendiente de XBB.1.5 y XBB.1.9.2, que ya se había detectado en España.

Esta situación generó cierta alarma, y muchas personas se preguntaban cómo ocurría esto, si teníamos una sólida inmunidad por la vacunación y por haber pasado muchos la infección, incluso algunos más de una vez.

El hecho de estar inmunizados o de haber pasado la infección nos protege de sufrir formas graves de la enfermedad, pero no de sufrir nuevas infecciones, pues ni las vacunas frente al SARS-CoV-2, ni la infección natural generan anticuerpos a nivel de la mucosa respiratoria, puerta de entrada del virus. La primera barrera protectora la tenemos en la sangre con los anticuerpos circulantes generados tras la vacunación o la infección, pero estos con el tiempo van disminuyendo hasta incluso desaparecer, lo que nos hace susceptibles a infectarnos. Esto se debe a que, aunque cuando volvemos a contactar con el virus, las células de memoria de nuestro sistema inmune ponen en marcha la producción de anticuerpos, esta tarda dos semanas mientras el virus, en tan solo 2-3 días, es capaz de producirnos la infección. Para estar protegidos de la infección necesitaríamos mantener permanentemente en sangre un elevado nivel de anticuerpos. Esta fue la razón de que, durante la pandemia, se administrasen varios recuerdos a las personas más vulnerables.

El pico se alcanzó en la semana 35/2023 (del 28 de agosto al 03 de septiembre de 2023) con 137,3 casos por 100.000 habitantes. Descendiendo a partir de entonces, coincidiendo con el regreso de la población desplazada

32. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/Informes%20semanales/Temporada_2022-23/Informe%20semanal_SiVIRA_392023.pdf

a sus hogares. El último dato de que disponemos es de la semana 39 (del 25 de septiembre al 1 de octubre de 2023), en la que la incidencia fue de 134,9 casos por 100.000 habitantes (147 en la semana previa), y la tasa de hospitalización de 2,5 casos por 100.000 habitantes (3,2 en la semana previa). A partir de la semana 40 (inicio del año epidemiológico 2023-2024 de las IRAs) la información que facilita el SIVIRA se reduce a simplemente el porcentaje de muestras positivas a SARS-CoV-2 en Atención Primaria y en los hospitales, sin datos de incidencia ni sobre las variantes circulantes, y un comentario, que en la semana 45/2023, del 6 al 12 de noviembre, reza así: «la actividad de COVID-19 desciende tanto en Atención Primaria como a nivel hospitalario», y en la semana 47/2023 (del 20 al 26 de noviembre): «La incidencia de COVID-19 se mantiene estable en todos los ámbitos, y la tasa de hospitalización se sitúa en 0,8 casos por 100.000 habitantes (1,6 en la semana previa). Por grupos de edad, las mayores tasas de hospitalización se observan en el grupo de los mayores de 79 años (6,1 casos por 100.000 h)». Descenso que también se produjo, en cuanto a la hospitalización e ingreso en UCI, en el conjunto de países de la Región Europea de la OMS[33].

A nivel mundial, a las 3:52 pm CET, del 30 de noviembre de 2023, se habían declarado a la OMS 772.052.752 caso confirmados de COVID-19, incluyendo 6.985.278 muertes. Las cifras reales son sin duda superiores sobre todo el número de casos que seguramente sobrepasó el millón. A 23 de noviembre se habían administrado 13.595.583.125 de dosis de vacuna[34].

7. RECOMENDACIONES VACUNALES FRENTE A COVID-19 PARA EL OTOÑO INVIERNO 2023-2024

El 12 de julio de 2023, la Comisión de Salud Pública, aprobó las *Recomendaciones de vacunación frente a gripe y COVID-19 en la temporada 2023-2024 en España*, elaboradas por la Ponencia del Programa y Registro de Vacunaciones, que fueron actualizadas el 12 de septiembre[35]. Se acordó, al igual que en años anteriores, hacer conjuntamente la vacunación del COVID-19 y la de la gripe, y teniendo en cuenta la situación epidemiológica actual de COVID-19, se recomendó la vacunación frente al COVID-19 a los grupos de población diana que se especifican en la tabla 11.

En cuanto al tipo de vacuna, se siguieron las recomendaciones de 18 de mayo de 2023 de la OMS[36] y la declaración conjunta de 6 de junio de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC)[37], de que se utilizasen vacunas de ARNm monovalentes frente a la subvariante XBB de la cepa ómicron, preferiblemente XBB.1.5, que asegure protección frente a las cepas circulantes de SARS-CoV-2. Vacunas que se pueden administrar independientemente del estado vacunal previo.

El 30 de agosto la EMA recomendó la autorización de la vacuna Comirnaty adaptada frente a la variante XBB.1.5 (BioNTech/Pfizer)[38], que se presenta en tres formulaciones, de 30, 10 y 3 mg/dosis, indicadas para personas de 12 y más años, de 5-11 años y de 6-59 meses respectivamente. Esta es la vacuna que se utilizó entonces en España.

8. VARIANTES DEL SARS-COV-2

El SARS-CoV-2, como virus RNA que es, cuando se multiplica comete errores dando lugar a mutaciones, con una frecuencia más alta que los virus DNA, aunque, los coronavirus producen menos mutaciones que la mayoría de los virus RNA porque codifican una enzima que corrige algunos de los errores cometidos durante la replicación. Por tanto, la aparición de nuevas variantes del SARS-CoV-2 era un hecho esperado y no en sí mismo un motivo de preocupación pues los virus cambian constantemente a través de las mutaciones, un subproducto natural de su replicación.

El destino de una mutación viene determinado en la mayoría de los casos por la selección natural. Aquellas que confieren al virus una ventaja competitiva con respecto a su multiplicación, transmisión o escape de la inmunidad, aumentarán en frecuencia, en tanto aquellas otras que reduzcan la aptitud viral desaparecerán.

El primer cambio importante en las propiedades del SARS-CoV-2 tuvo lugar a principios de la pandemia, en marzo-abril de 2020, cuando la cepa original fue reemplazada en todo el mundo por una nueva variante llamada

33. Vigilancia centinela de Infección Respiratoria Aguda en Atención Primaria (IRAs) y en Hospitales (IRAG): Gripe, COVID-19 y VRS. Semana 47/2023 (del 20 al 26 de noviembre de 2023). https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/Informes%20semanales/Temporada_2023-24/Informe%20semanal_SiVIRA_472023.pdf
34. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. https://covid19.who.int/
35. https://www.sanidad.gob.es/areas/promocionPrevencion/vacunaciones/gripe_covid19/docs/RecomendacionesVacunacion_Gripe-Covid19.pdf
36. WHO. Statement on the antigen composition of COVID-19 vaccines. World Health Organization, may 2023. https://www.who.int/news/item/18-05-2023-statement-on-the-antigen-composition-of-covid-19-vaccines
37. ECDC-EMA statement on updating COVID-19 vaccines composition for new SARS-CoV-2 virus variants. European Center for Disease Prevention and Control – European Medicines Agency; 2023 jul. https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/ecdc-ema-statement-updating-covid-19-vaccines-composition-newsars-cov-2-virus-variants_en.pdf
38. Recomendación de autorización de Comirnaty XBB.1.5: https://www.ema.europa.eu/en/news/comirnaty-emarecommends-approval-adapted-covid-19-vaccine-targeting-omicron-xbb15

Tabla 11. Recomendaciones de vacunación frente a gripe y COVID-19 en la temporada 2023-2024 en España, elaboradas por la Ponencia del Programa y Registro de Vacunaciones, que fueron actualizadas el 12 de septiembre

A. Por el mayor riesgo de complicaciones o cuadros graves en caso de padecer estas infecciones:

1. Personas de 60 años o más.
2. Personas de 5 años o más internas en centros de discapacidad y residencias de mayores, así como otras personas institucionalizadas de manera prolongada y residentes en instituciones cerradas.
3. Personas menores de 60 años con las siguientes condiciones de riesgo[I]:
   - Diabetes mellitus y síndrome de Cushing.
   - Obesidad mórbida (índice de masa corporal ≥40 en adultos, ≥35 en adolescentes o ≥3 DS en la infancia).
   - Enfermedades crónicas cardiovasculares, neurológicas o respiratorias, incluyendo displasia broncopulmonar, fibrosis quística y asma.
   - Enfermedad renal crónica y síndrome nefrótico.
   - Hemoglobinopatías y anemias o hemofilia, otros trastornos de la coagulación y trastornos hemorrágicos crónicos, así como receptores de hemoderivados y transfusiones múltiples.
   - Asplenia o disfunción esplénica grave.
   - Enfermedad hepática crónica, incluyendo alcoholismo crónico.
   - Enfermedades neuromusculares graves.
   - Inmunosupresión (incluyendo las inmunodeficiencias primarias y la originada por la infección por VIH o por fármacos, así como en los receptores de trasplantes 2 y déficit de complemento).
   - Cáncer y hemopatías malignas.
   - Fístula de líquido cefalorraquídeo e implante coclear o en espera del mismo.
   - Enfermedad celíaca.
   - Enfermedad inflamatoria crónica.
   - Trastornos y enfermedades que conllevan disfunción cognitiva: síndrome de Down, demencias y otras.
4. Embarazadas en cualquier trimestre de gestación y mujeres durante el puerperio (hasta los 6 meses tras el parto y que no se hayan vacunado durante el embarazo).
5. Personas convivientes con aquellas que tienen alto grado de inmunosupresión: en general se refiere a trasplantadas de progenitores hematopoyéticos, trasplantadas de órgano sólido, insuficiencia renal crónica, infección por VIH con bajo recuento de CD4 (<200 cel/ml), algunas inmunodeficiencias primarias y aquellas sometidas a ciertas terapias inmunosupresoras. También se podrán incluir convivientes de personas con otras enfermedades de mayor riesgo y mayores, definidos en los subapartados 1 y 3.

B. Para reducir el impacto y el mantenimiento de servicios críticos y esenciales a la comunidad:

6. Personal de centros y establecimientos sanitarios y sociosanitarios públicos y privados (tanto sanitarios como no sanitarios).
7. Personas que trabajan en servicios públicos esenciales, con especial énfasis en los siguientes subgrupos:
   - Fuerzas y cuerpos de seguridad del Estado, con dependencia nacional, autonómica o local, así como las Fuerzas Armadas.
   - Bomberos.
   - Servicios de protección civil.

[I] En población infantil se priorizará la vacunación frente a COVID-19 a aquellos con condiciones que inducen alto grado de inmunosupresión, como: trasplante de progenitores hematopoyéticos, trasplante de órgano sólido, fallo renal crónico, infección por VIH con bajo recuento de CD4, algunas inmunodeficiencias primarias y aquellas sometidas a ciertas terapias inmunosupresoras.

D614G (Doug)[39] que se replicaba y transmitía más eficientemente[40].

En junio de 2020 se creó el Grupo de Trabajo de la OMS sobre Evolución Viral, centrado específicamente en las variantes del SARS-CoV-2, su fenotipo y su impacto en las contramedidas, que más tarde se convirtió en el Grupo Consultivo Técnico sobre la Evolución del Virus SARS-CoV-2[41]. La aparición de variantes que suponían un mayor riesgo para la salud pública mundial, a finales de 2020, hizo que la OMS, de acuerdo con su riesgo para la salud humana estableciese dos niveles[42]:

- *Variantes de preocupación o VOC* (por las siglas en inglés de Variants of Concern): Variantes con elevada transmisibilidad, debido a un aumento de su capacidad de unión al receptor ACE2, que va a suponer un incremento de casos y por tanto de la presión asistencial, o que conlleven un aumento de la gravedad

39. Korber, B., Fischer, W.M., Gnanakaran, S. *et al.*; Sheffield COVID-19 Genomics Group. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. Cell. 2020; 182(4): 812-827. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043

40. Hou, Y.J., Chiba, S., Halfmann, P. *et al.* SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo. Science. 2020; 370(6523): 1464-1468. DOI: 10.1126/science.abe8499

41. https://www.who.int/groups/technical-advisory-group-on-sars-cov-2-virus-evolution

42. https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants

y/o letalidad, o de la capacidad de evadir la respuesta inmune.

— *Variantes de Interés o VOI* (por sus siglas en inglés, de Variant of Interest). Variantes para las que existen indicios de aumento de la transmisibilidad, gravedad y/o escape de la respuesta inmune con menor grado de certeza.

El 31 de mayo de 2021, la OMS acordó utilizar las letras del alfabeto griego para nombrar las VOC y las VOI en las comunicaciones públicas, como etiquetas fáciles de pronunciar y no estigmatizantes, manteniendo los sistemas de nomenclatura establecidos por GISAID, Nextstrain y Pango para su uso científico, para nombrar y rastrear los linajes genéticos del SARS-CoV-2.

En marzo de 2023, la OMS actualizó su sistema de seguimiento incluyendo junto a las VOC y VOI, las *Variantes Bajo Vigilancia* (VUM, por sus siglas en inglés)[43] que incluyen a cualquier variante del SARS-CoV-2 con cambios en el genoma que se sospeche que afecten a las características del virus y que parecen indicar que la variante puede presentar riesgos en el futuro, a pesar de la falta de evidencia clara de los cambios que puede provocar en el fenotipo o características epidemiológicas del virus, y que se considera necesario mantener en seguimiento y seguir estudiándola hasta disponer de más información.

La pertenencia a uno u otro grupo varió con el tiempo. Han sido en algún momento VOC las variantes alfa (B.1.1.7), beta (B.1.351), gamma (P.1), delta (B.1.617.2), y ómicron (B.1.1.529 linajes: BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5). Variantes de interés (VOI) han sido eta (B.1.525), iota (B.1.526), kappa (B.1.617.1), lambda (C.37), épsilon (B.1.1.7 / B.1.429), zeta (P.2 linaje B.1.1.28), y theta (P.3 linaje B.1.1.28). Variantes Bajo Vigilancia (VUM) la R1-R2, B.1.466.2, B.1.621, B.1.1.318, B.1.1.519, C.36.3-C.36.3.1, B.1.214.2, B.1.1.523, B.1.619 y B.1.620. La relación no es exhaustiva.

A 23 de octubre de 2023 son VOI los sublinajes y recombinaciones de la ómicron: XBB.1.5, XBB.1.16, y EG.5, y VUM: DV.7, XBB, XBB.1.9.1, XBB.1.9.2, XBB.2.3 y BA.2.86.

Las variantes detectadas a lo largo de la pandemia fueron muy numerosas, pero solo unas pocas tuvieron importancia. En nuestro país las responsables de cada período epidémico u ola fueron: en 2020, la D614G («Doug») del primero, y la 20A.EU1 (A222V) del segundo. En 2021, la alfa del tercero y cuarto (dominó entre las semanas 6 y 25); la delta del quinto (dominó entre las semanas 26 y 50), y la ómicron del sexto, dominando a partir de la semana 51[44] con sus cinco linajes (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4 y BA.5) y sublinajes derivados de estos, durante el resto de 2022 y 2023, hasta el fin de la pandemia, continuando en la actual situación de endemia.

El linaje BA.1 fue el mayoritario durante la primera fase de expansión de ómicron (predominante entre las semanas 1 a 8 de 2022). El BA.2, que presenta numerosas diferencias respecto a BA.1, fue aumentando hasta convertirse en el linaje predominante a nivel global desde marzo hasta junio de 2022 (semanas 9 a 23). El 30 de junio sembró la alarma la aparición del sublinaje BA.2.75, al que se dio el nombre de «Centaurus», por su velocidad de transmisión cinco veces mayor que BA.1, pero se quedó en eso. Posteriormente, los linajes BA.2.12.1, BA.4 y BA.5, que mostraban una ventaja de crecimiento sobre BA.2, fueron aumentando progresivamente su prevalencia a nivel global. Las mutaciones presentes en estos linajes (particularmente frente a BA.1) les otorgaron mayor escape inmune.

A mediados de junio de 2022, coincidiendo con un aumento de la incidencia, el BA.5, con mayor ritmo de crecimiento, reemplazó al BA.2, imponiéndose en julio como linaje dominante en España (semanas 24 a 44), siendo reemplazado a partir de la semana 45 por su derivado el BQ.1 (con cinco mutaciones en la proteína S con respecto a BA.5) y BQ.1.1 (con dos mutaciones más, también en la proteína S), identificados a mediados de julio en Nigeria[45]. El 20 de octubre, el ECDC consideró a los sublinajes BQ.1 y BQ.1.1 variantes de interés, y en la semana 1 de 2023, suponían el 80,8 % de los secuenciados en España[46]. Se le ha apodado «Cerbero» o «Cancerbero», nombre del perro de tres cabezas del dios Hades de la mitología griega, que guardaba la puerta del inframundo, asegurando que los muertos no salieran y los vivos no pudieran entrar.

A partir de ese momento, comenzó un período de gran diversificación de los linajes BA.2, BA.4 y BA.5 y recombinantes, con mutaciones relacionadas con mayor escape inmune respecto de las variantes previamente circulantes. El ECDC consideró a varios de esos linajes como variantes de interés: BQ.1*, BA.2.75*(incluyendo CH* y BN*), XBB* y XBB.1.5*. El asterisco indica que se incluyen los linajes derivados de ellos.

43. file:///Users/juanjesusgestalotero/Downloads/annex1_updated_working_definitions_17-08-2023.pdf

44. Comité Técnico de RELECOV. Informe anual de la Red de Laboratorios de Secuenciación de SARS-CoV-2 (RELECOV): 2021. 30 de junio de 2023.

45. Comité Técnico de RELECOV. Informe anual de la Red de Laboratorios de Secuenciación de SARS-CoV-2 (RELECOV): 2022. 30 junio 2023. https://www.sanidad.gob.es/areas/alertasEmergenciasSanitarias/alertasActuales/nCov/documentos/2023-06-28-Informe_anual_Integracion_secuenciacion_2022.pdf

46. Actualización de la situación epidemiológica de las variantes de SARS-CoV-2 en España (22 noviembre 2022). https://www.sanidad.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/COVID19_Actualizacion_variantes_20221122.pdf

El XBB es un recombinante derivado de los sublinajes BA.2.10.1 (BJ.1) y BA.2.75 (BM.1.1.1), del que derivó el XBB.1 y de este el XBB.1.5 (XBB.1 + S:F486P), que, en febrero de 2023, se convirtió en el dominante a nivel global, en marzo en España. Se le ha apodado «Kraken», enorme y colosal criatura marina (pulpo, calamar gigante o medusa) de la mitología nórdica que, emergiendo de las profundidades, ataca barcos y devora a los marineros. Este linaje presenta una mutación en la posición 486 (F486P) que le confiere la capacidad de evasión de la respuesta a los anticuerpos que ya presentaban XBB o XBB.1, pero afecta en menor grado a la unión al receptor ACE2, lo que podría implicar una mayor capacidad de transmisión respecto a XBB y XBB.1.

El 17 de abril, la OMS incluyó entre las Variantes de Interés (VOI) al linaje XBB.1.16 (XBB.1 + S:E180V, S:K478R y S:F486P), recombinante de los sublinajes BA.2.10.1 (BJ.1) y BA.2.75 (BM.1.1.1), dado su aumento simultáneo y ventaja de crecimiento frente al linaje dominante en varios países. Este linaje añade las mutaciones E180V y K478R a las de XBB y presenta una capacidad de evasión a la respuesta inmune comparable a la de XBB.1.5, pero no se ha relacionado con un aumento en la gravedad de los casos.

A partir de junio, el XBB.1.5 y sublinajes derivados, XBB.1.5-like+F456L, se hicieron predominantes. El 10 de agosto el ECDC instó a monitorizar como variante de interés (VOI) la XBB.1.5-like+F456L, que incluye los linajes similares a XBB.1.5, que se caracterizan por un conjunto específico de mutaciones (S:Q183E, S:F486P y S:F490S), con la mutación adicional F456L. La categoría general XBB.1.5-like+F456L, incluye los sublinajes EG.5, apodado «Eris», nombre de la diosa griega de la discordia, visto por primera vez en febrero de 2023, que comprende EG.5 (XBB.1.9.2 + S:F456L), EG.5.1 (EG.5 + S:Q52H), HK.3 (EG.5 + S:Q52H, S:L455F) y HV.1 (EG.5 + S:Q52H, S:F157L, S:L452R), que la OMS asignó recientemente como variante de interés (VOI), y los sublinajes FL.1.5.1 y XBB.1.16.6.

En el informe del SIVIRA, correspondiente a la semana 39 de 2023 (del 25 de septiembre al 1 de octubre)[47], último, como dijimos antes, que publica información sobre los linajes y sublinajes dominantes, señala que las variantes predominantes en las últimas semanas fueron XBB.1.5-like+F456L (53,6 %) y XBB.1.5 (32,1 %).

A 23 de octubre de 2023, la OMS considera variantes de interés (VOI) la XBB.1.5, XBB,1,16 y EG.5, y bajo vigilancia (VUM) la DV.7 (CH.1.1 + S:N185D, S:L859I), desde el 19 de enero de 2023; XBB (BA.2+ S:V83A, S:Y144-, S:H146Q, S:Q183E, S:V213E, S:G252V, S:G339H, S:R346T, S:L368I, S:V445P, S:G446S, S:N460K, S:F486S, S:F490S), desde el 19 de agosto de 2022; XBB.1.91 (recombinante de los sublinajes BA.2.10.1 y BA.2.75, es decir, BJ.1 y BM.1.1.1. XBB.1 + S:F486P), y XBB.1.9.2 (recombinante de los sublinajes BA.2.10.1 y BA.2.75, es decir, BJ.1 y BM.1.1.1. XBB.1 + S:F486P, S:Q613H), desde el 5 de diciembre de 2022; XBB.2.3 (recombinante de los sublinajes BA.2.10.1 y BA.2.75, es decir, BJ.1 y BM.1.1.1. XBB + S:D253G, S:F486P, S:P521S), desde el 9 de diciembre de 2022, y BA.2.86 (mutaciones de un posible ancestro BS.2), desde el 24 de julio de 2023.

9. USO DE MASCARILLA

Entre las medidas de control no farmacológicas que han tenido un mayor impacto en la evolución de la pandemia, destacan las de protección personal y, en particular, el uso de mascarillas en diversos ámbitos, cuyas recomendaciones de uso y obligatoriedad se han ido adaptando al conocimiento de la enfermedad y, sobre todo, a la evolución de la pandemia y las necesidades de control de la transmisión. Esta medida ha permitido suavizar otras con impacto socioeconómico mayor y mantener una mayor interacción social. El uso de la mascarilla ha sido una medida clave de control de la COVID-19.

La obligatoriedad del uso de la mascarilla se estableció el 9 de junio de 2020[48] para las personas de 6 y más años en los siguientes supuestos:

a) En la vía pública, en espacios al aire libre y en cualquier espacio cerrado de uso público o que se encuentre abierto al público, siempre que no resulte posible garantizar el mantenimiento de una distancia de seguridad interpersonal de, al menos, 1,5 metros.
b) En los medios de transporte aéreo, marítimo, en autobús, o por ferrocarril, así como en los transportes públicos y privados complementarios de viajeros en vehículos de hasta nueve plazas, incluido el conductor, si los ocupantes de los vehículos de turismo no conviven en el mismo domicilio. En el caso de los pasajeros de buques y embarcaciones, no será necesario el uso de mascarillas cuando se encuentren dentro de su camarote o en sus cubiertas o espacios exteriores cuando resulte posible garantizar el mantenimiento de una distancia de seguridad interpersonal de, al menos, 1,5 metros.

47. SIVIRA. Vigilancia centinela de Infección Respiratoria Aguda en Atención Primaria (IRAs) y en Hospitales (IRAG) Gripe, COVID-19 y otros virus respiratorios Semana 39/2023 (del 25 de septiembre al 1 de octubre de 2023) N.º 151. 5 de octubre de 2023. https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/GRIPE/Informes%20semanales/Temporada_2022-23/Informe%20semanal_SiVIRA_392023.pdf

48. Real Decreto-ley 21/2020, de 9 de junio, de medidas urgentes de prevención, contención y coordinación para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. «BOE» núm. 163, de 10 de junio de 2020. https://www.boe.es/buscar/pdf/2020/BOE-A-2020-5895-consolidado.pdf

Quedaban exentas de la obligación las personas que presentasen algún tipo de enfermedad o dificultad respiratoria que pudiera verse agravada por el uso de la mascarilla o que, por su situación de discapacidad o dependencia, no dispusiesen de autonomía para quitarse la mascarilla, o bien presentasen alteraciones de conducta que hiciesen inviable su utilización. Tampoco sería exigible en el caso de ejercicio de deporte individual al aire libre, ni en los supuestos de fuerza mayor o situación de necesidad o cuando, por la propia naturaleza de las actividades, el uso de la mascarilla resultase incompatible, con arreglo a las indicaciones de las autoridades sanitarias. Al no haber suficientes existencias de mascarillas en el mercado, estas medidas no se aplicaron hasta mediados de julio.

El 29 de marzo de 2021, la ley 2/2021[49] dejó sin efecto la obligatoriedad del uso de la mascarilla en exteriores, volviendo a hacerse obligatoria el 23 de diciembre de 2021, a raíz del incremento importante de casos ocasionado por la variante ómicron[50]. Medida de carácter temporal que se volvió a abandonar el 8 de febrero de 2022[51], manteniéndola en eventos multitudinarios al aire libre cuando los asistentes estén de pie o, si están sentados, cuando no se pueda mantener una distancia de seguridad de al menos 1,5 metros entre personas o grupos de convivientes. Quedando obligatorio su uso en cualquier espacio cerrado de uso público o abierto al público; en los medios de transporte aéreo, en autobús, o por ferrocarril, incluyendo los andenes y estaciones de viajeros, o en teleférico, así como en los transportes públicos y privados complementarios de viajeros en vehículos de hasta nueve plazas, incluido el conductor, si los ocupantes de los vehículos de turismo no conviven en el mismo domicilio, y en espacios cerrados de buques y embarcaciones cuando no se pueda mantener la distancia de seguridad de 1,5 metros, salvo grupos de convivientes.

Dicha obligación no era exigible a las personas con algún tipo de enfermedad o dificultad respiratoria que pueda verse agravada por el uso de la mascarilla o que, por su situación de discapacidad o dependencia, no dispongan de autonomía para quitarse la mascarilla, o bien presenten alteraciones de conducta que hagan inviable su utilización; en el caso de que, por la propia naturaleza de las actividades, el uso de la mascarilla resulte incompatible, con arreglo a las indicaciones de las autoridades sanitarias, y en aquellos lugares o espacios cerrados de uso público que formen parte del lugar de residencia de los colectivos que allí se reúnan, como son las instituciones para la atención de personas mayores o con discapacidad, las dependencias destinadas a residencia colectiva de trabajadores esenciales u otros colectivos que reúnan características similares, siempre y cuando dichos colectivos y los trabajadores que allí ejerzan sus funciones tengan coberturas de vacunación contra el SARS-CoV-2 superiores al 80 % con pauta completa y de la dosis de recuerdo, acreditado por la autoridad sanitaria competente. Esta última excepción no se aplicará a los visitantes externos, ni a los trabajadores de los centros residenciales de personas mayores o con discapacidad, ya que en este caso sí es obligatorio el uso de mascarilla.

9.1. Abandono de la mascarilla en interiores

A partir del 20 de abril de 2022 se abandonó la obligatoriedad del uso de la mascarilla en interiores con algunas excepciones (trabajadores y visitantes de centros asistenciales y personas ingresadas cuando estén en espacios compartidos fuera de su habitación; trabajadores y visitantes en centros sociosanitarios, no para usuarios de residencias, ya que se entiende que ese es su hogar), y en el transporte público, dejando que en las empresas sean los Servicios de Prevención de Riesgos Laborales los que, en base a las evaluaciones de riesgos y a su conocimiento sobre los trabajadores vulnerables, decidan en que lugares o circunstancias debe mantenerse la obligatoriedad de su uso.

Pero esto no quiere decir que no se deba seguir utilizando cuando se considere que pueda haber riesgo de infectarse (locales mal ventilados, con mucha ocupación) sobre todo por parte de las personas vulnerables, y por supuesto si se es positivo para evitar contagiar a los demás.

9.2. Fin de la obligatoriedad del uso de la mascarilla

El 8 de febrero de 2023, dejó de ser obligatorio el llevar mascarilla en el transporte público, pero se mantuvo en los establecimientos y servicios sanitarios y para trabajadores y visitantes de los centros sociosanitarios[52].

49. Ley 2/2021, de 29 de marzo, de medidas urgentes de prevención, contención y coordinación para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. https://www.boe.es/buscar/pdf/2021/BOE-A-2021-4908-consolidado.pdf

50. Real Decreto-ley 30/2021, de 23 de diciembre, por el que se adoptan medidas urgentes de prevención y contención para hacer frente a la crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19. BOE Núm. 307 del 23 de diciembre de 2021. https://www.boe.es/eli/es/rdl/2021/12/23/30/dof/spa/pdf

51. Real Decreto 115/2022, de 8 de febrero, por el que se modifica la obligatoriedad del uso de mascarillas durante la situación de crisis sanitaria ocasionada por el COVID-19. https://www.boe.es/boe/dias/2022/02/09/pdfs/BOE-A-2022-2062.pdf

52. Real Decreto 65/2023, de 7 de febrero, por el que se modifica la obligatoriedad del uso de mascarillas durante la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19. https://www.boe.es/eli/es/rd/2023/02/07/65/dof/spa/pdf

Finalmente, el 5 de julio de 2023, el mismo día de la publicación en el BOE del acuerdo del consejo de ministros por el que se declara la finalización de la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19, decayó la obligatoriedad de llevar mascarilla en los lugares en donde aún continuaba siéndolo (centros y servicios sanitarios, farmacias y centros sociosanitarios). En un anexo recomienda seguir utilizándola en los centros sanitarios: por las personas sintomáticas cuando estén en espacios compartidos; por los profesionales que atienden a casos sintomáticos; por las personas que trabajan en Unidades de Cuidados Intensivos y en unidades con pacientes vulnerables, siguiendo las recomendaciones de control de infección aconsejadas por los Servicios de Medicina Preventiva y Prevención de Riesgos Laborales según la valoración del riesgo de cada centro sanitario; en las urgencias hospitalarias o de Atención Primaria, incluida la sala de espera; en los centros residenciales de personas mayores y personas con discapacidad, en caso de aparición de síntomas en trabajadores, residentes o visitantes, para evitar brotes, cuidando en todo caso el bienestar físico y emocional de los mayores[53].

53. Orden SND/726/2023, de 4 de julio, por la que se publica el Acuerdo del Consejo de ministros de 4 de julio de 2023, por el que se declara la finalización de la situación de crisis sanitaria ocasionada por la COVID-19. https://www.boe.es/boe/dias/2023/07/05/pdfs/BOE-A-2023-15552.pdf

Se terminó de imprimir este libro
el día 17 de abril de 2026,
en los talleres gráficos
de ¿¿??