

INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

---

**INTERFERONES Y VACUNAS COMO  
CONTROL DE ENFERMEDADES  
PREVALENTES**

DISCURSO DEL  
**EXCMO. SR. DON MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ**

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 26 DE ENERO DE 2006  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICO DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DE LA  
**EXCMA. SRA. D.<sup>a</sup> MARÍA CASCALES ANGOSTO**



MADRID - 2006

Depósito legal: M. 52.290-2005

Imprime: REALIGRAF, S. A.  
Pedro Tezano, 26  
28039 Madrid

*A mis queridos padres y hermanos.*

*A mi mujer, M.<sup>a</sup> Victoria, e hijos, Julia y Jorge,  
por todo su apoyo y cariño.*



## ÍNDICE

	<u>Págs.</u>
PALABRAS DE SALUTACIÓN .....	7
JUSTIFICACIÓN DEL TEMA .....	13
A) Enfermedades prevalentes en el siglo XXI .....	15
B) Defensa contra infecciones virales: respuesta inmune innata y adquirida .....	17
C) Los interferones como primera línea de defensa .....	20
C.1. Descubrimiento de los interferones .....	20
C.2. Clonación de los interferones y el resurgir de la biotecnología .....	22
C.3. Descubrimiento de la cascada de señalización por interferones .....	24
C.4. Descubrimiento del modo de acción de los interferones ..	26
C.5. La proteína quinasa PKR como mediador antiviral y antitumoral de los interferones .....	26
C.6. Inducción de apoptosis por la proteína quinasa PKR .....	29
C.7. El sistema de 2-5A sintetasa/RNasa L como antiviral y antitumoral de los interferones .....	31

	<i>Págs.</i>
C.8. Evasión de los virus a la acción de los genes de defensa inducidos por los interferones .....	33
C.9. Hacia el descubrimiento de nuevos genes inducidos por las enzimas de defensa, PKR y 2-5A sintetasa/RNasa L.	36
C.10. Aplicaciones clínicas de los interferones .....	37
D) Las vacunas como segunda línea de defensa del organismo	38
D.1. Descubrimiento del proceso de vacunación: la erradicación de la viruela .....	39
D.2. Características de los Poxvirus .....	41
D.3. El ciclo replicativo de Poxvirus .....	43
D.4. El genoma de Poxvirus .....	45
D.5. Respuesta inmune frente a Poxvirus .....	46
D.6. Utilización de Poxvirus recombinantes como vacunas contra distintas enfermedades .....	48
D.7. Hacia una nueva generación de vacunas basadas en Poxvirus .....	52
E) Transferencia de la investigación básica a la clínica: promoción de ensayos clínicos en fase I/II .....	55
F) Protección de la investigación: patentes .....	56
EPÍLOGO .....	57
BIBLIOGRAFÍA .....	58
CONTESTACIÓN AL DISCURSO DE INGRESO A CARGO DE LA EXCMA SRA. D. <sup>a</sup> MARÍA CASCALES ANGOSTO.	71

## PALABRAS DE SALUTACIÓN

*Excelentísimo Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,*

*Excelentísimas Señoras Académicas,*

*Excelentísimos Señores Académicos,*

*Señoras y Señores:*

Al encaminar mis pasos hacia el estrado de esta Real Academia Nacional de Farmacia, y contemplar a las personalidades y público presentes en este distinguido recinto, no he podido evitar que pasaran por mi mente a gran velocidad, como si de la activación de un circuito neuronal se tratara, un sinfín de pensamientos por el alto honor que representa ser Académico de Número. Gratitud a todos los miembros por su generosidad al aceptarme como uno más de esta familia y por haber depositado su confianza en este castellano de Tierra de Campos que después de muchos años en el extranjero ha vuelto a sus orígenes, como ave migratoria, para ofrecer a esta Docta Corporación la experiencia de una carrera científica y académica a la que me he dedicado y dedico con pasión.

Mi comparecencia hoy no hubiera sido posible sin la generosidad y confianza de los Señores Académicos que apadrinaron la presentación de mi candidatura, los Excelentísimos Señores Antonio Doadrio López, María Cascales Angosto y Bernabé Sanz-Pérez. Mi gratitud y afecto a

estos miembros de la Real Academia por la confianza puesta en mi persona, para optar a una vacante de Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Igualmente, mi agradecimiento a María Cascales Angosto por su admirable ejemplo de ser la primera mujer académica, y por su confianza, benevolencia y honor que me hace al contestar a mi discurso de ingreso y presentar mi historial científico y académico.

Tampoco mi comparecencia hoy hubiera sido posible sin el cariño de todas aquellas personas que me animaron a llevar a cabo aquello que más me apasiona, investigar. Indudablemente, mi enorme gratitud va dirigida hacia mis padres, un farmacéutico y una maestra en Villalón de Campos, por inculcarme valores esenciales en el ser humano, honestidad, seriedad, confianza, perseverancia, profesionalidad y optimismo. A mis cinco hermanos por todo su apoyo y cariño y por mantenernos unidos. Muy especialmente, mi agradecimiento va dirigido a mi mujer María Victoria, e hijos Julia y Jorge, por toda su comprensión y cariño, y por aportarme esa energía que uno necesita para llevar a cabo con alegría y optimismo el trabajo de cada día. Y también gracias a toda esa gran familia que nos une por lazos de consanguinidad o por otras circunstancias.

También quiero agradecer a mis maestros de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Santiago de Compostela, los Profesores Benito Regueiro Varela y Ramona Vahamonde (para todos Ramonita), por haberme introducido en el campo fascinante de la Microbiología, e inspirarme esa curiosidad de empezar a indagar durante mi Tesis Doctoral en los mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos. A Ramonita por inculcarme la meticulosidad y seriedad experimental, así como por su impulso para que adquiriera formación científica en laboratorios extranjeros. Durante los estudios de la licenciatura de Farmacia tuve la suerte de tener como Profesores a los Académicos, Sanz Pedro, Gómez-Serranillos, Cadorniga Carro, Miñones Trillo y Cabezas Fernández. A todos ellos, a los que nos han dejado y a los que siguen labrando con su esfuerzo el buen hacer de la Academia, mi más sincero agradecimiento.

Un recuerdo especial a mis maestros en mis años en el extranjero. Durante mi etapa en Londres, en el National Institute for Medical Research, a Helio Pereira, Jefe del Departamento de Virología, por su confianza y ánimo para que siguiera la carrera científica; a David

Metz, por sus enseñanzas en el campo de los interferones; a Ian Kerr, por introducirme en el campo emergente del control de la síntesis de proteínas. En mi etapa americana, un agradecimiento especial al Profesor Walter Schlesinger, un apasionado científico y humanista, que me contrató y animó a seguir mis investigaciones al otro lado del Atlántico, en un tema que se empezaba a abordar a nivel molecular, como era entender la biología de los virus y su interacción con el hospedador. A John Hollowzack, por darme la oportunidad de realizar estudios en transcripción y replicación del DNA. En mi corta etapa en Bélgica, a Walter Fiers, por incorporarme a su grupo y adquirir conocimientos en el nuevo campo que se iniciaba de la secuenciación de DNA y clonaje de genes virales. De vuelta a los Estados Unidos, como Assistant Profesor en la Facultad de Medicina de la Universidad del Estado de Nueva York, a los Profesores Roston Bablanian y Alfred Stracher, por su inestimable ayuda para que pudiera crear grupo independiente. Es precisamente a partir de esta fase en Nueva York cuando se incorpora a mi laboratorio mi mujer María Victoria y un buen número de investigadores, con nutrida representación de españoles, quienes en sus etapas pre y postdoctorales han contribuido a que el grupo realizara una fructífera labor investigadora. A mi regreso a España en el año 1992, he tenido la fortuna de rodearme de un grupo de jóvenes investigadores, dotados de un gran entusiasmo y formación para, conjuntamente, desarrollar una excelente y competitiva labor investigadora. A todo el personal científico y técnico que ha trabajado y sigue trabajando en mi laboratorio, mi más sincero agradecimiento por sus contribuciones en el área de interacción virus-célula, usando como modelo el virus *vaccinia* que se utilizó para erradicar la viruela, desde su entrada en la célula, transcripción, regulación de la síntesis de proteínas, replicación, morfogénesis, hasta su uso como vacuna recombinante contra distintas enfermedades, como la malaria, sida, leishmaniasis, y el papel de los interferones como controladores de la replicación viral.

Indudablemente, hay otras muchas más personas que de forma directa o indirecta han contribuido a mi formación como persona, como científico y académico, y a las que estoy muy agradecido. Muy especialmente al que fue destacado miembro y Director de esta Real Academia, Excelentísimo Señor Don Rafael Cadórniga Carro, cuya vacante tengo el honor de ocupar.

Deseo decir unas palabras sobre mi predecesor en la Medalla número 33, cuyo vacío me habéis llamado a ocupar y cuya extraordinaria ejecutoria profesional quiero exponer. Conocí al Profesor Cadórniga en el año 1965, siendo alumno en la asignatura de Farmacia Galénica en la antigua Facultad de Farmacia, ubicada entonces en el Palacio de Fonseca en Santiago de Compostela. Como los demás alumnos de aquella asignatura, entre los que se encontraba mi buen amigo y Académico Alfonso Domínguez-Gil Hurlé, y la asignatura que nos impartió al año siguiente, Técnica Profesional, sus clases estaban siempre al completo, ya que no podíamos perder frase alguna en su disertación, pues era todo un ejemplo de exposición magistral, clara y precisa. Muy llamativo por aquel entonces eran los exámenes. Para alumnos no acostumbrados a la defensa oral de una materia, que prácticamente éramos todos, el diálogo que se establecía entre profesor y alumno era un ejemplo de lo que años más tarde y en Londres, valoraría como exponente de lo que se debe de hacer en ciencia y en docencia, es decir, saber interpretar los conocimientos, dialogar y transmitir la información. Un exponente de la personalidad del Profesor Cadórniga fue mostrar su humanidad y camaradería con todos los que participamos en el viaje fin de carrera a Mallorca, viajando desde Santiago de Compostela en un pequeño autobús hasta Valencia, barco hasta la isla, con regreso por Barcelona y vuelta en autobús. Fue toda una experiencia de compañerismo en la que el Profesor Cadórniga además nos cautivó por su sencillez y amabilidad exquisita. Tuvieron que pasar muchos años, a mi regreso de los Estados Unidos recibí una invitación del Profesor Cadórniga, entonces Director de la Real Academia, para presentar en esta Real Academia una ponencia sobre el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) como puente entre la investigación básica y el sector empresarial, lo que hice con mucho gusto como Director del CNB el día 30 de mayo de 1996. Posteriormente, fui invitado por la Fundación Casares Gil a exponer mis investigaciones sobre vacunas, siendo presentado por el que fue también mi querido Profesor e impulsor al conocimiento de la Bioquímica, el Académico José Antonio Cabezas Fernández del Campo.

Permítaseme comentar en sucintas palabras el *curriculum vitae* del Profesor Cadórniga, aunque injustamente por la brevedad, pero que ha sido excelentemente recogido en los Anales de la Real Academia de Farmacia (2000) con motivo de la Sesión Necrológica sobre su trayectoria humana y profesional (1).

Rafael Cadórniga Carro (1927-1999) nació en Lugo el 1 de julio de 1927 y al año de edad su familia se trasladó a la ciudad de León, donde en 1938 inició sus estudios de bachillerato, para continuarlos en Santiago de Compostela e iniciar la carrera de Farmacia, terminando su licenciatura en 1951 con Premio Extraordinario. Su carrera científica y docente se inicia en el laboratorio de Fisicoquímica bajo la dirección del Profesor Enrique Otero Aenlle, obteniendo el título de Doctor en 1953, con Premio Extraordinario. En 1954 ganó por oposición el cargo de Profesor Adjunto de Fisicoquímica, encargándose de la cátedra en el curso 1955-56. Desde 1955 a 1972 fue farmacéutico Jefe de Farmacia del Hospital Clínico de Santiago de Compostela. En 1972 fue nombrado Jefe del Servicio de Farmacia del Hospital General de Galicia, actividad que desempeñó hasta su traslado a la Universidad de Madrid, desde 1975 hasta su jubilación en 1992. El Profesor Cadórniga ingresó el 14 de abril de 1983 en la Real Academia de Farmacia con el discurso «Vigencia de la educación farmacéutica. Posible proyección hacia el futuro», siendo contestado por el que fue su maestro y guía, Enrique Otero Aenlle. El Profesor Cadórniga ha sido un miembro muy activo en distintas instituciones. Ocupó la Dirección de la Real Academia de Farmacia en diciembre de 1991 hasta el mes de febrero de 1998, habiéndose distinguido por su buen hacer, laboriosidad, fomento de la Fundación José Casares Gil, e impulsor de importantes obras de remodelación y acondicionamiento de la Real Academia. Ha sido Miembro Numerario de la Real Academia Nacional de Medicina (1988), y de la Real Academia Nacional de Doctores (1993), así como Miembro de Honor de la Academia Iberoamericana de Ciencias Farmacéuticas (1995), de la Academia de Ciencias Farmacéuticas de Chile (1988), de la Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica (1944) y Miembro fundador del Comité Científico Europeo de Biofarmacia y Farmacocinética. Fue impulsor y Presidente de la Comisión que elaboró la Real Farmacopea Española de 1997. El Profesor Cadórniga ha sido premiado con numerosas distinciones, tales como el Premio de la Real Academia de Farmacia del Instituto de España, el Premio de Investigación del Colegio Oficial de Farmacéuticos de León, la medalla del Ayuntamiento de Clemon-Ferrand y la medalla Especial del Comité Científico Europeo de Biofarmacia y Farmacocinética. En 1999, después de su fallecimiento, fue nombrado Miembro Correspondiente de la German Pharmaceutical Society, y el 25 de junio de 2000 el Ministro de Educación y Cultura le otorgó, a

título póstumo, la Gran Cruz de Alfonso X El Sabio, como reconocimiento de su aportación a la sociedad española, entregando la Condecoración a su esposa doña Irene Valiño en Sesión Solemne de Apertura de Curso.

El Profesor Cadórniga fue un vanguardista y pionero en su faceta científica y académica. Supo transmitir la enseñanza de la Farmacia Galénica de forma ejemplar, contagiando a otros muchos, creando escuela con magníficos discípulos, e introduciendo la Biofarmacia y Farmacocinética en el mundo académico. Aplicó sus muchos conocimientos de Físicoquímica al campo de la cinética y «biodisponibilidad» de medicamentos, término que junto con el de «bioequivalencia» fueron acuñados e introducidos en el léxico farmacogalénico por el propio Profesor Cadórniga, al que siempre le preocupó el correcto uso del castellano, probablemente por sus años en León. Fue impulsor y Presidente de la Asociación Española de Docentes de Farmacia Galénica. Sus actividades científicas han sido variadas, desde emulsiones y complejos de asociación entre tensoactivos aniónicos y fármacos de carácter catiónico, estabilidad física de las emulsiones, estabilidad química de los principios activos, disoluciones de sólidos, quiralidad y formas sólidas de liberación modificada. Sus contribuciones científicas y como maestro han sido excelentemente glosadas por su discípulo el Académico Alfonso Domínguez-Gil Hurlé en la Sesión Necrológica en homenaje al Profesor Cadórniga y recogidas en los Anales de la Real Academia. Impulsó la vertiente tecnológica en los servicios de farmacia hospitalaria, potenció secciones de Farmacotecnia, creó Unidades de Nutrición Parenteral y racionalizó la preparación de soluciones antisépticas en colaboración con los Servicios de Medicina Preventiva. En una época donde la interacción entre el mundo académico y el sector empresarial eran casi inexistentes, Rafael Cadórniga mantuvo un estrecho contacto con la industria farmacéutica, participando en proyectos conjuntos de colaboración. Hoy esta colaboración entre sector académico-empresa es una reconocida necesidad de la comunidad científica y de las naciones para trasladar el conocimiento básico a la sociedad.

El Profesor Cadórniga fue un hombre excepcional, por lo que ocupar su vacante representa un gran reto. Ha sido mi orientación en la búsqueda de fármacos con capacidad de controlar procesos infecciosos, lo que me ha llevado a tratar de entender la biología de los agentes

causales de enfermedades y su interacción con el hospedador, para de esta forma ir desarrollando herramientas que permitieran su control. En este sentido la trayectoria científica del Profesor Cadórniga en el conocimiento y uso óptimo de medicamentos y la mía en el control de agentes infecciosos con productos biológicos y vacunas se entrecruzan. Esto me ha motivado a elegir el tema de mi discurso de ingreso que lleva por título **«Interferones y vacunas como control de enfermedades prevalentes»**.

## **JUSTIFICACIÓN DEL TEMA**

Iniciamos el nuevo milenio con una población superior a los 6.000 millones de personas en nuestro planeta y con unas necesidades claras en educación, sanidad, alimentación, medio ambiente y en infraestructuras. Aunque ha habido una mejora sustancial en la calidad de vida de los ciudadanos debido fundamentalmente al papel que ha jugado la ciencia, sin embargo, esta distribución ha sido desigual entre países. Los avances espectaculares en los últimos cincuenta años en genética, con la secuenciación del genoma humano en el año 2001 y su anotación final en 2003, en informática con el aumento de las comunicaciones por Internet, los superordenadores como el *Mare Nostrum*, y enormes bases de datos, nos están asegurando avances espectaculares por la aplicación de la ciencia al bienestar social en el nuevo milenio. Estos avances, en las áreas de salud, agricultura y medioambiente, tienen un gran impacto mundial. Es indudable que estamos abordando en profundidad y a nivel molecular las causas de las enfermedades infecciosas, trastornos cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, alteraciones genéticas y cáncer, que permitirán una mejor calidad de vida de los ciudadanos. Hoy hablamos de que se podrá realizar una medicina más dirigida, al poderse conocer los genes que influyen un determinado proceso patológico y su respuesta al tratamiento con fármacos. La tecnología de «biochips» se está utilizando cada vez más para determinar la correlación entre expresión de genes y patología de distintas enfermedades, identificándose los genes responsables, así como los que determinan resistencias a fármacos en humanos. El concepto de medicación «a la carta» o personalizada, se implementará en los hospitales y habrá un resurgir de la industria farmacéutica dedicada a cubrir una demanda social. La producción de medicamentos por métodos biotecnológicos

está sustituyendo a los procedimientos tradicionales, por ser más seguros y económicos. En pocos años tendremos un arsenal terapéutico amplio y con mayor especificidad. La capacidad de transferir genes de unas especies a otras posibilita la modificación de microorganismos, plantas y animales con fines benéficos. El conocimiento de los mecanismos de diferenciación celular hace posible que partiendo de células totipotentes de un individuo se puedan regenerar tejidos y órganos dañados y así repararlos, evitando el rechazo que se produce en trasplantes. La utilización de células madre con fines terapéuticos tendrá sus beneficios a largo plazo.

Pero, a medida que avanzamos en conocimientos científicos nos encontramos con grandes retos: el control de enfermedades con una amplia distribución global como el SIDA, malaria, tuberculosis, hepatitis C, o de pandemias como las producidas anualmente por la gripe o las que se pronostican en un futuro próximo, como la gripe aviar o el síndrome respiratorio agudo grave (SARS). Es de todos conocido que la inmunización es el método más exitoso y económico de intervención. Así, se ha conseguido erradicar a la viruela y reducir la incidencia de polio en un 99 por 100, consiguiendo además reducciones dramáticas en enfermedades como difteria, tétanos, tosferina, paperas y sarampión. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lleva a cabo un programa de vacunación masivo contra un buen número de enfermedades para las cuales existen vacunas, y su objetivo es que en 2010 la vacunación alcance al 90 por 100 de la población y así evitar los más de 2,5 millones de muertes anuales de niños con edad inferior a los cinco años por enfermedades que se pueden prevenir con las vacunas actuales. Aún así, hoy en día se estima que hay más de 27 millones de niños y 40 millones de mujeres embarazadas que no han sido vacunados. Además, el reto de la OMS es poder controlar enfermedades para las que no tenemos vacunas eficaces, como las mencionadas anteriormente.

Se considera que las enfermedades infecciosas son la tercera causa de mortandad en la población, mientras que el cáncer es la segunda y las enfermedades cardiovasculares la primera causa. La necesidad de luchar contra estas enfermedades que afectan a una gran parte de la población mundial ha sido reconocida por la Unión Europea que en su VI Programa Marco priorizó ayudas a la investigación dirigidas a desarrollar estrategias de control contra las mismas; esta prioridad conti-

nuará en el VII Programa Marco que se encuentra en su fase final de elaboración. También, el Plan Nacional en el Programa de Biotecnología consideró como objetivo científico-técnico prioritario el diseño de nuevas vacunas, tanto preventivas como terapéuticas, para luchar contra las enfermedades de mayor impacto sanitario. Que la línea temática de vacunas es prioritaria lo refleja el hecho de que los Institutos Nacionales de Salud (NIH) de los Estados Unidos de América y la Fundación de Bill y Melinda Gates financian fuertemente la investigación en vacunas contra enfermedades prevalentes como el SIDA, malaria y tuberculosis. Esta necesidad ha sido reconocida por el grupo G-8, con representación de los países más poderosos de nuestro planeta.

Como Miembro del Grupo de Expertos que asesora a la OMS en su programa de vacunas y agentes biológicos, he considerado oportuno que este discurso de ingreso en la Real Academia Nacional de Farmacia se refiera al control de enfermedades prevalentes con gran incidencia en la población, basado en la utilización de agentes biológicos y vacunas como mecanismos de defensa. Como modelo de agente biológico describiré a los interferones por su capacidad para actuar como primera línea de defensa del organismo (respuesta innata), para pasar posteriormente a describir a las vacunas (respuesta adquirida) y cómo podemos hacerlas más eficaces, dirigiendo de forma selectiva la respuesta inmune del organismo contra procesos infecciosos y tumorales. Es posible que con inteligencia seamos capaces de manipular nuestro sistema inmune mediante el uso de interferones y vacunas, y así obtener mayores efectos en el tratamiento de infecciones y tumores.

Permítaseme antes hacer una breve descripción sobre la incidencia de alguna de las enfermedades infecciosas más prevalentes en la población para las que no tenemos vacunas, y de otras que resisten a la acción de fármacos.

## **A) Enfermedades prevalentes en el siglo XXI**

Desde que en 1798 Edward Jenner desarrollara la primera vacuna contra la viruela, el éxito de la vacunación se ha visto reflejado en que muchas de las enfermedades infecciosas que producían gran mortandad en la población, especialmente en niños, se han podido controlar. La

única enfermedad considerada erradicada ha sido la viruela. A pesar de los avances espectaculares aportados por las nuevas tecnologías de la genómica, proteómica y bioinformática y la elucidación del genoma humano (2, 3) y el de otros muchos microorganismos, en el inicio del siglo XXI nos encontramos con grandes enfermedades para las cuales no hay procedimientos eficaces de control. El impacto de estas enfermedades a nivel mundial es muy grande, causando altas tasas de mortalidad. Consideremos algunos ejemplos de enfermedades prevalentes. Así, una de cada cinco personas de los 6.000 millones de la población global están expuestas a malaria, con una tasa de infección anual de unos 300 millones de personas infectadas, de las cuales entre 1,5-3 millones mueren, siendo los menores de cinco años los más afectados (4). La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias causadas por varias especies del género *Leishmania*. La OMS ha estimado que unos 12 millones de personas están infectadas, y que cerca de 300 millones de personas tienen el riesgo de contraer la infección (5), con una incidencia anual de 1,5 a 2 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea y 500.000 nuevos casos de leishmaniasis visceral (6). Esta parasitosis es zoonótica en los países mediterráneos, donde el perro doméstico es el reservorio principal. La especie endémica en el mediterráneo es *L. infantum*, que infecta tanto humanos como perros, causando lesiones cutáneas y viscerales. Los estudios epidemiológicos indican que en áreas endémicas estables, como en el caso de España, hasta el 48 por 100 de los perros están infectados (7-9), el 50 por 100 de los cuales evoluciona hacia leishmaniasis visceral (10, 11). La OMS ha estimado que entre el 2 al 9 por 100 de todos los pacientes con SIDA en el sur de Europa desarrollarán leishmaniasis visceral por *L. infantum*, siendo esta enfermedad parasitaria la más prevalente entre la población VIH-positiva (12). En la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) existe una gran incidencia de leishmaniasis, siendo el perro doméstico el reservorio natural de la infección por *L. infantum*. En el caso del SIDA, en el año 2005 la pandemia causó más de 3 millones de defunciones, estimándose en 5 millones las personas que contrajeron el virus a lo largo del año, lo que eleva a más de 42 millones el número de personas infectadas en todo el mundo, habiendo producido la muerte a más de 22 millones de personas desde que se identificó el origen de la pandemia. Las diferencias geográficas y económicas de esta enfermedad son evidentes, donde más del 95 por 100 de los casos y 95 por 100 de las muertes por SIDA ocurren en el tercer mundo (70 por 100

en África), sobre todo entre jóvenes adultos, con un incremento progresivo entre las mujeres (OMS, 2005). Es dramático contemplar cómo en África, región sub-sahariana, la epidemia sigue extendiéndose y que en muchos países los porcentajes de personas infectadas y con SIDA son muy elevados, lo que tiene efectos devastadores para las familias y para la economía productiva (13, 14). España continúa siendo el país con mayor número de personas infectadas por el VIH de la UE, alrededor de 150.000 personas. La hepatitis C es otro ejemplo de enfermedad infecciosa que afecta a unos 300 millones de personas de forma crónica y cuya tasa de infección es bastante elevada, con un 1-3 por 100 de las personas seropositivas en Europa (15, 16). En el caso de la tuberculosis, se considera que es una de las infecciones que más muertes produce, 2-3 millones por año, debido a que ha aumentado su virulencia por resistencia a los antibióticos y co-infección con el VIH (14). En el caso del cáncer y considerando la población de EE.UU, unas 500.000 personas mueren anualmente, más de 1.500 por día, con unos 5 millones de defunciones desde el año 1990 (17). La predicción es que para el año 2005 se produzcan cerca de 13 millones de muertes por cáncer. Por todo ello, la OMS considera prioritario el desarrollar vacunas profilácticas y/o terapéuticas contra todas estas grandes enfermedades.

Para llevar a cabo el desarrollo de una vacuna es necesario conocer los mecanismos de defensa del organismo frente al patógeno o célula tumoral, conocer la biología del patógeno, identificar los antígenos involucrados en la inducción de una respuesta inmune específica, disponer de modelos experimentales en los que se pueda ensayar la eficacia de la vacunación, así como implementar ensayos clínicos para determinar la seguridad y eficacia de la vacunación. Describiré a continuación los dos brazos del sistema inmune responsables del control de procesos infecciosos.

## **B) Defensa contra infecciones virales: respuesta inmune innata y adquirida**

Vivimos en un mundo rodeado de un ingente ejército de agentes infecciosos. El número de partículas infectivas a las que estamos expuestos es enorme. El organismo dispone de una serie de barreras que nos protegen contra las infecciones. Una de ellas es física, como la piel,

que es el órgano más largo del cuerpo, pesando más de 5 kg en un adulto, otras son las mucosas, secreciones, enzimas en las lágrimas, pH ácido estomacal, reflejo de la tos. Sin embargo, cuando se sobrepasan las barreras físicas entra en acción el poderoso sistema inmune. Uno de sus más apreciados atributos es su capacidad para reconocer y destruir a las células infectadas en el conjunto de células sin infectar. Esto no es sorprendente ya que las personas inmunocomprometidas son muy vulnerables a procesos infecciosos. Los procesos críticos de defensa inmune son: reconocimiento del patógeno, ampliación de la respuesta y control del patógeno. Una infección viral debe de ser reconocida inmediatamente, y las defensas activarse y controlar la infección.

La respuesta inmune contra infecciones virales consiste en la defensa innata (no específica) y la adquirida (específica). La respuesta innata es la primera línea de la defensa inmune, funcionando continuamente en el organismo, sin previo ataque por un virus invasor. Este sistema no es específico, ya que responde esencialmente frente a cualquier intruso. La defensa innata está codificada por genes de la línea germinal que han surgido en la evolución de organismos multicelulares y son esenciales en la sobrevivencia de la especie humana. Sabemos que la defensa innata es la que dicta la conducta de la respuesta inmune adquirida. ¿Cómo se activa la respuesta innata? Conocemos una serie de características bioquímicas comunes o inducidas por el mundo microbiano, como los receptores semejantes a Toll (TLRs: *Toll-like receptors*) que reconocen al lipopolisacárido bacteriano y a otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAPMs: *Pathogen Associated Molecular Patterns*). Los eventos moleculares intracelulares iniciados por la interacción entre TLRs y sus PAPMs específicos desencadenan respuesta inflamatoria (18, 19). La respuesta innata a infecciones virales se compone de potentes activadores proteicos llamados interferones y que inducen un estado antiviral en las células infectadas; una colección compleja de proteínas del suero llamadas complemento, que una vez activadas destruyen células infectadas, partículas virales y otros microorganismos; linfocitos citolíticos, llamados células asesinas (NK) que reconocen y destruyen células infectadas. Los macrófagos y neutrófilos juegan también un papel importante en la respuesta innata.

La respuesta inmune adquirida consiste en la producción de anticuerpos, llamada respuesta humoral, y la mediada por linfocitos,

llamada respuesta celular. Este sistema se llama respuesta adquirida (de adaptación), porque no solamente diferencia lo propio de lo infectado, sino que también va dirigido hacia el invasor, de forma que una combinación de moléculas solubles (anticuerpos y citoquinas) junto con linfocitos participan en la acción antiviral. Los linfocitos B se producen en la médula ósea mientras que los linfocitos T se producen en el timo, migrando ambos a los órganos linfoides secundarios (bazo y nódulos linfáticos) donde tiene lugar la respuesta inmune.

Las células T reconocen al antígeno a través de sus receptores de membrana TCR (*T cell receptor*). El antígeno es degradado y procesado por las células presentadoras del antígeno a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Existen dos subpoblaciones principales de linfocitos, CD4+ y CD8+. Las células CD8+ reconocen a los antígenos de células infectadas con virus o a las tumorales, destruyéndolas mediante la liberación de proteínas que forman poros en la célula diana y la inducción de factores que inducen apoptosis (muerte celular programada). Los linfocitos CD4+ se activan al reconocer al antígeno expuesto en las células presentadoras, secretando citoquinas capaces de favorecer una reacción inflamatoria. Algo muy importante es que la respuesta inmune adquirida tiene memoria, de forma que cuando el sistema queda expuesto a nuevas invasiones del mismo patógeno, desencadena una respuesta específica que normalmente para a la infección al poco de producirse. Los receptores de la respuesta adquirida que reconocen patógenos han sido creados mediante reordenación genética durante la diferenciación de las células blancas de la sangre, llamados linfocitos.

Las repuestas innata y adquirida están interconectadas y coordinadas por mecanismos de señalización que les permite interaccionar mutuamente. Existen una serie de células (linfocitos derivados de la médula, células T de ayuda Th, células B, NK, mononucleares, dendríticas, granulocitos, neutrófilos, entre otras) y de citoquinas (interferones tipo I y II, TNF, TGF, IL-2,-3-4-5-6-7-10-12-15-18, entre otras) que definen tanto la respuesta innata como la adquirida. Estos marcadores de activación de la respuesta inmune son utilizados para diferenciar y definir el grado de respuesta inmune frente a una infección o en un proceso de vacunación.

Unas de las moléculas biológicas más activas en defensa antiviral de la respuesta inmune innata son los interferones (IFNs), que pertenecen a la familia de citoquinas que son proteínas que regulan procesos esenciales de comunicación intracelular. Debido a la relevancia de estas citoquinas, a su interés clínico y a mi deseo por desentrañar los misterios de su modo de acción, algo que vengo investigando desde hace muchos años en proyectos científicos financiados por instituciones americanas y europeas, quisiera exponer en este discurso algunas características de estas moléculas que han sido pioneras en el descubrimiento de moléculas biológicas con múltiples actividades (actividad antiviral, antitumoral y reguladores del sistema inmune), como motor en el desarrollo de la biotecnología moderna, como llave que nos ha abierto la puerta a conocer las cascadas de señalización intracelular, desde su interacción con el receptor en la membrana celular al proceso de activación en el núcleo de genes específicos y su capacidad para controlar patógenos, regular el ciclo celular o la respuesta inmune.

## **C) Los interferones como primera línea de defensa**

### *C.1. Descubrimiento de los interferones*

Los interferones (IFN) constituyen el ejemplo más representativo de productos biológicos sintetizados por el organismo en cantidades muy pequeñas, pero con propiedades importantes. Actúan en primera línea de defensa del organismo contra infecciones virales, parasitarias y tumores. Junto con los llamados *Toll-like receptors* (TLRs) descubiertos en estos últimos años, que son receptores de transmembrana de tipo I que reconocen moléculas conservadas de patógenos, constituyen la familia de receptores más importante para detectar la presencia e iniciar la defensa contra patógenos. Los TLR, de los cuales conocemos de momento once miembros, son capaces de inducir citoquinas pro-inflamatorias, primar la inmunidad adquirida e inducir IFN. El trabajo desarrollado con los IFNs, dado su interés sanitario, ha servido como ejemplo de que la investigación básica es rentable y que los fundamentos de la investigación aplicada se basan en avances del conocimiento científico. Hoy en día, los IFNs son uno de los productos biotecnológicos más vendidos en el mundo. Ya en el año 1999, se fabricaron 3 kilogramos valorados en 4.000 millones de dólares, para el tratamiento

de cánceres, infecciones virales y enfermedades neurodegenerativas. La verdad es que los IFNs han sido el motor para que la industria farmacéutica se interesara por la biotecnología, con lo que ello ha supuesto de cambio en el concepto tradicional de escalado y purificación de productos biológicos. Han revolucionado además, la medicina hospitalaria, ya que al ser una de las primeras sustancias naturales obtenidas por ingeniería genética, su administración en pacientes ha permitido establecer procedimientos de control y seguimiento, así como de obtención de datos farmacológicos, posteriormente aplicados a otros productos biológicos obtenidos del organismo.

Pero ¿qué son los IFNs? La historia próxima de su noción comienza en 1957, con el descubrimiento de cierta sustancia protectora contra los virus por Alick Isaacs and Jean Lindeman, del Instituto Nacional de Investigaciones Médicas de Londres (NIMR) (20, 21). Como la mayoría de los descubrimientos, éste nació de observaciones rigurosas y de la intuición de los investigadores para percatarse de la importancia de sus observaciones. El experimento inicial fue sencillo. Incubaron células de embrión de pollo durante 24 horas en un medio de cultivo con virus de la gripe, previamente inactivado por radiaciones ultravioleta. Observaron que se liberaba de las células, al medio de cultivo, cierto producto; éste cuando se añadía a células frescas procedentes de embriones de pollo, impedía («interfería») la replicación de la estirpe salvaje y lítica del virus de la gripe. Es decir, las células así tratadas quedaban totalmente protegidas contra la infección por el virus gripal. Debido a que el principio activo «interfería» (impedía) la replicación vírica, se le bautizó con el nombre de *interferón*. La comunidad científica internacional comenzó a interesarse por la nueva molécula. Se vio que su actividad biológica trascendía la función antivírica para ejercer también efectos antitumorales y reguladores del sistema inmune.

Con el tiempo se halló que no se trataba de una sola proteína. Había un conjunto de genes que codificaban distintos interferones (22, 23). Podemos reducirlos a dos clases principales: el interferón de tipo I (alfa y beta) y el de tipo II (gamma). El IFN de tipo I lo producen todo tipo de células, mayoritariamente los fibroblastos y células leucocitarias en respuesta a infecciones víricas, inducidos por la síntesis de RNA bicatenario como intermediario en la replicación vírica. El IFN de tipo II lo fabrican los linfocitos Th1 y células NK en respuesta a mitógenos.

Dentro del IFN de tipo I hay, a su vez, dos clases: el IFN- $\alpha$ , que procede de una familia multigénica de 12 subtipos, y el IFN- $\beta$ , que está codificado por un solo gen. Los genes del tipo I se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 9. En el tipo II, el IFN- $\gamma$  también está codificado por un solo gen, localizado en el cromosoma 12. Esta diversidad de IFNs añade complejidad a sus acciones finales y a los mecanismos involucrados en esos procesos. Una vez producido, el IFN es liberado de la célula actuando de forma autocrina y paracrina para estimular su receptor en la célula infectada y en las células adyacentes.

En los últimos años se ha elucidado el mecanismo de inducción de IFN por virus y RNA bicatenario (24-26). El RNA bicatenario, producto de la replicación viral, probablemente liberado al medio por lisis de células infectadas se une al TLR3 para estimular la transcripción de IFN del tipo I a través de la activación del factor IRF3, así como por miembros de la familia de NF- $\kappa$ B y AP1. Además, existen otras moléculas, identificadas recientemente como RIG (*retinoic acid-inducible gene*) y MDA5 (*melanoma differentiation associate gene 5*) que son helicinas con el dominio DexD/H y que al activarse por RNA bicatenario activan también la producción de IFN por la misma ruta de IRF3 (22). Sin lugar a dudas, la célula ha desarrollado una serie de mecanismos que responden a estrés causado por distintos agentes, como los virus, con la finalidad de estabilizarse hasta que el estrés haya desaparecido o si no para cometer suicidio en un intento de evitar la propagación del virus en el organismo. El entendimiento de los mecanismos moleculares por los que la célula decide su viabilidad o muerte por apoptosis es un tema de gran interés en biología.

## C.2. Clonación de los interferones y el resurgir de la biotecnología

Durante la década de los años setenta emerge la nueva genética molecular, al obtenerse el primer DNA recombinante en 1972 por Paul Berg (Premio Nobel de Química en 1980), y al demostrar Herbert Boyer y Stanley Cohen en 1973, que las bacterias podían servir de factorías para fabricar proteínas de interés, como la insulina y la somatostatina. La aprobación del primer fármaco producido por ingeniería genética ocurre en 1980 y es la insulina humana, mientras que se aprueba la primera vacuna recombinante contra la hepatitis B en 1986. En 1980,

el grupo de C. Weissmann, de Zurich, clonaba el primer gen del IFN de tipo I en la enterobacteria *Escherichia coli* (27, 28). De inmediato hay un salto espectacular en el sector farmacéutico que, al disponer del IFN en cantidad, puede pensar en aplicarlo como agente terapéutico contra virus y tumores. Como ocurrió con la penicilina, fue EE.UU. el que tomó la antorcha de que el IFN era un producto de gran interés farmacéutico.

Desde el nacimiento de la nueva biotecnología, las compañías farmacéuticas dependen de las biotecnológicas como fuente principal de fármacos. Así en los últimos diez años, el número de fármacos biotecnológicos ha crecido considerablemente, existiendo en la actualidad unos 1.800 biofármacos en desarrollo, con 340 en las últimas etapas del desarrollo o pendientes de aprobación, siendo el 36 por 100 de estos fármacos compuestos biológicos (vacunas, anticuerpos, proteínas terapéuticas). Hay unos 370 fármacos y vacunas biotecnológicas en ensayos clínicos, dirigidos contra más de 200 patologías y unos 100 tests diagnósticos basados en biotecnología. Actualmente el 20 por 100 de todos los fármacos en el mercado se obtienen por procedimientos biotecnológicos. En el 2004 la FDA (*Food and Drug Administration*) de EE.UU. aprobó 31 nuevas moléculas, la cifra más alta desde 1999. Si se analiza el año 2002, de los 29 nuevos fármacos que se pusieron en el mercado, 13 correspondían a EE.UU., 8 a la UE y 7 a Japón. Se estima que actualmente la facturación mundial del sector biotecnológico asciende a casi 30.000 millones de euros, y esta facturación se incrementará significativamente en los próximos años. Un nuevo medicamento cuesta desarrollarlo unos 600 millones de euros, de los que el 65 por 100 son gastos en investigación clínica. Por ello el sector farmacéutico está concentrado en 13 grandes empresas. España, a pesar de ser la novena potencia económica mundial, ocupa un lugar muy por debajo en el sector farmacéutico y biotecnológico (informe Cotec, 2005).

La disponibilidad de la proteína IFN en estado puro y el interés por conocer su mecanismo de acción, alentaron los pasos siguientes: desentrañar la estructura de la proteína, conocer su interacción con la membrana celular e identificar las señales intracelulares emitidas.

Para desvelar la estructura se recurre al análisis de difracción de rayos X. Se supo así que los IFNs son proteínas que se asocian consigo mismas para formar dímeros, con unión a dominios específicos. Poste-

riormente, gracias a la clonación de los receptores de IFNs de tipo I y II, se demostró que tales receptores eran proteínas integrales de la membrana de tipo I (atraviesan una vez la membrana plasmática). Los receptores constan de una parte extracelular, implicada en la unión a los IFNs, una parte transmembrana y una parte intracelular, necesaria esta última para transmitir a la célula distintas señales (24).

### C.3. *Descubrimiento de la cascada de señalización por interferones*

Había que identificar el mecanismo de acción de los IFNs. ¿Cómo pueden unos factores solubles ejercer acciones tan dispares y, a la vez, tan específicas? Aunque se ha avanzado bastante en la respuesta, persisten muchos cabos sueltos. Fruto del empeño investigador conocemos las cascadas de señalización que llegan desde la membrana de la célula y terminan en la inducción de múltiples genes del núcleo. De forma elegante, el grupo de George Stark, Sandra Pellegrini e Ian Kerr, de la Fundación Imperial de Investigaciones Oncológicas de Londres, y el de James Darnell del neoyorquino Instituto Rockefeller consiguieron, a finales de los años ochenta y comienzo de los noventa, descifrar los procesos moleculares mediante los cuales los IFNs, tras unirse al receptor, activan la transcripción de genes específicos, genes que determinan su propia funcionalidad (29). Conocemos ya los mecanismos ligeramente distintos empleados por los IFNs de tipo I y de tipo II. La señalización inducida por el tipo I consta de varios pasos. En una primera etapa la llegada de IFN- $\alpha$  o IFN- $\beta$  provoca la heterodimerización del receptor. Este proceso desencadena una cascada de fosforilaciones en tirosinas, en la que intervienen diversas proteínas mediadoras (TYK2, JAK1, STAT1 y STAT2), pertenecientes a la familia de proteína quinasas *Janus* y de señales activadoras de la transcripción (STAT: *signal transducers and activators of transcription*). En virtud de la fosforilación JAK1/TYK2, las proteínas STAT1 y STAT2 pueden formar dímeros y, con esa forma, alcanzar el núcleo después de su interacción con el factor IRF-9. Instalado en el núcleo, el dímero constituido por ambas proteínas STAT junto a IRF-9 (complejo proteico llamado factor ISGF3) se comporta como un factor de transcripción específico de secuencia, estimulando la expresión de un conjunto de genes mediante su unión a la secuencia ISRE (*interferon-sequence responsive elements*).

El proceso difiere un poco en respuesta a IFN- $\gamma$ . Las dos subunidades de los receptores de IFN- $\gamma$  se encuentran separadas; una subunidad interacciona con JAK1 y la otra con JAK2, dos quinasas de tirosinas. La llegada del IFN- $\gamma$  a las células induce la dimerización de cada una de las subunidades del receptor. Esto posibilita que JAK1 y JAK2 se encuentren lo suficientemente cerca como para activarse por fosforilación. JAK1, activada por autofosforilación, puede en ese estado fosforilar y activar a JAK2. La fosforilación de las quinasas de tirosinas promueve el reclutamiento de STAT1 (que reconoce a las tirosinas fosforiladas de las JAKs y se une a ellas).

La proteína STAT1 constituye la siguiente víctima de la cascada de fosforilación inducida por IFN- $\gamma$ . Una vez fosforilada, STAT1 forma homodímeros; éstos, igual que ocurría con los heterodímeros STAT 1 y 2, pasan al núcleo, donde actúan como factores de transcripción que regulan la expresión de múltiples genes (23, 30, 31). Se están descubriendo otras cascadas de señalización independiente de JAK-STAT que también intervienen en respuesta a los IFNs (22).

El descubrimiento del mecanismo de señalización en respuesta a IFNs, pionero en ese ámbito de la biología molecular, puso las bases para el conocimiento de la señalización mediada por otras citoquinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, etc., hasta cerca de 30 distintas), que ejercen funciones clave en la defensa del organismo contra patógenos y tumores.

Los genes inducidos en la fase de transcripción por los IFNs serán los responsables últimos de los efectos ejercidos por las citoquinas. Así, los distintos IFNs inducirán la síntesis de diferentes conjuntos de proteínas (unas comunes, otras particulares para cada caso). Mediante ensayos con «chips» de DNA se han identificado entre 100 y 200 genes inducidos en respuesta a cada una de las tres clases de IFNs,  $\alpha$ ,  $\beta$ , o  $\gamma$  (32). Esto nos da una idea de la complejidad y especificidad de las respuestas ejercidas por tales factores. Probablemente, esta complejidad aumente cuando dispongamos en detalle del análisis transcripcional completo de los aproximadamente 25.000 genes que se expresan en el genoma humano. Hasta estos ensayos, sólo se tenía constancia de la inducción por los IFNs de una treintena de proteínas, cuya misión particular se ignoraba en la mayoría de los casos.

Entre las proteínas inducidas por IFNs cuya acción está comprobada, las hay con propiedades antivirales como la proteína quinasa activada por RNA bicatenario, PKR, las proteínas Mx, la óxido nítrico sintetasa (iNOS) o la familia de 2'-5'-oligoadenilato sintetetas, más conocidas como 2-5A, antitumorales (como PKR, IRF-1, p21), o proteínas con capacidad de regular distintos aspectos de la respuesta inmunitaria (complejo principal de histocompatibilidad, LMPs, TAPs) entre otras muchas (22, 33).

#### C.4. *Descubrimiento del modo de acción de los interferones*

En la década de los setenta, el grupo de investigación del Instituto Nacional de Investigaciones Médicas (NIMR) en Londres, entre los que me encontraba, acometimos una serie de experimentos que llevaron a la demostración de que el interferón inhibía la replicación vírica en el proceso de traducción del RNA mensajero. Se cuestionaba por entonces el carácter proteínico del IFN y que sirviera para algo. Junto con David Metz, trabajando en el mismo laboratorio donde se había descubierto la existencia de la molécula, publicamos un artículo en *Nature* y otros varios posteriormente, que demostró su modo de acción a nivel de iniciación en la síntesis de proteínas, lo que dio un impulso importante a dichas moléculas (34). Además, en colaboración con el grupo de Ian Kerr en el mismo Instituto, sacamos a la luz, entre 1971 y 1975, una serie de trabajos que consolidaron al IFN como un regulador de la síntesis de proteínas (35-38). Dos de las rutas implicadas en esa acción son las que afectan a la enzima PKR y al sistema de las 2-5A sintetasa/RNasa L.

#### C.5. *La proteína quinasa PKR como mediador antiviral y antitumoral de los interferones*

La proteína quinasa PKR es un importante mediador de las acciones de los IFNs. Se ha demostrado que participa en su acción antivírica y antitumoral. PKR es una proteína de 551 aminoácidos codificada por un gen único, localizado en el cromosoma 2p21, con un dominio quinasa serina/treonina en el extremo C-terminal. En particular, la PKR ejerce una acción antivírica frente a virus con RNA y DNA como el virus de la

inmunodeficiencia humana, el virus vaccinia, el virus de la estomatitis vesicular, el virus de la encefalomiocarditis, entre otros (39). En nuestro laboratorio del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC hemos demostrado que esta enzima inhibe al virus *vaccinia* bloqueando la síntesis de proteínas, reduciendo la formación de partículas virales, provocando la muerte celular por apoptosis y activando la inducción de genes específicos involucrados en respuesta inmune, proliferación y apoptosis (40-49). Valoraremos mejor la importancia de la proteína quinasasa PKR en la respuesta antivírica si advertimos que muchos virus (VIH, virus de la gripe, reovirus, virus de la hepatitis C, herpesvirus, adenovirus, entre otros) usan diversas estrategias para bloquear la síntesis o acción de la enzima, contrarrestando así sus efectos deletéreos para la replicación vírica, de lo que hablaremos más adelante (26).

La exquisita sensibilidad de PKR como antiviral viene ayudada por el hecho de necesitar de RNA bicatenario para activarse. El RNA bicatenario no se encuentra normalmente en las células, y es producido como un intermediario durante la replicación viral, de esta forma PKR se activa selectivamente durante la infección viral. Para que se produzca la activación de PKR es suficiente con que el RNA tenga una estructura bicatenaria entre 30-85 pares de bases. La interacción con RNA bicatenario provoca que la PKR forme homodímeros y que se autofosforile en residuos de serina/treonina, incluyendo los residuos de treonina en las posiciones 446 y 451 (50, 51).

Como ya hemos dicho, una de las formas de actuación de PKR es mediante la inhibición de la síntesis de proteínas. Una vez activada, PKR fosforila a la subunidad pequeña del factor de iniciación eucariótico 2 (eIF-2 $\alpha$ ) en la serina 51. Esta fosforilación resulta en la formación de un complejo inactivo compuesto por eIF-2-GDP y el factor eIF2B que resulta en la rápida inhibición de la síntesis de proteínas. El factor eIF2B se encuentra en cantidades limitantes en la célula, por lo que su secuestro e inactivación por la fosforilación de eIF-2 $\alpha$  conlleva a una inhibición generalizada de la síntesis de proteínas. El factor eIF-2 es un heterotrímero compuesto de tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que funcionan por su asociación con GTP (guanosina trifosfato) y el iniciador met-tRNA<sub>i</sub> para formar el complejo ternario. Este complejo lleva el met-tRNA<sub>i</sub> a la subunidad ribosómica 40S junto con otros factores traduccionales incluyendo eIF-3 para formar el complejo de preinicia-

ción 43S. Este complejo 43S/eIF se asocia con el mRNA cerca del extremo 5' m<sup>7</sup>G-cap y avanza en dirección 3' hasta encontrar el triplete de iniciación AUG en el contexto de la secuencia apropiada de Kozak. Una vez que este codon ha sido reconocido, GTP unido a eIF-2 es hidrolizado en una reacción catalizada en parte por el factor eIF-5. A continuación, met-tRNA<sub>i</sub> es liberado del complejo ternario para iniciar la síntesis de la cadena peptídica nascente y el factor eIF-2 se disocia del complejo de iniciación 43S. El GDP asociado con el factor libre eIF-2 es intercambiado por GTP mediante la actividad del complejo eIF2B, que es un heteropentámero compuesto por las subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ). Después del intercambio de GTP, el factor eIF-2 se incorpora en un nuevo complejo ternario, con lo que comienzan nuevos ciclos de iniciación (52).

Además de regular la síntesis de proteínas, PKR también modula la acción de uno de los factores claves en transcripción, el factor NF- $\kappa$ B, regulando así la expresión de diversos genes anti y proapoptóticos. En nuestro laboratorio hemos contribuido a definir el mecanismo de activación de NF- $\kappa$ B por PKR (41, 45, 53, 54). El factor de transcripción NF- $\kappa$ B, descubierto por el premio Nobel David Baltimore, es un dímero compuesto de diversos factores de la familia de proteínas Rel/NF- $\kappa$ B, que se activa en respuesta a muy diversos estímulos; por ejemplo, citoquinas proinflamatorias, infección por virus o bacterias, o diferentes tensiones, químicas o físicas (55, 56).

Demostremos que en presencia de PKR entra en acción el factor NF- $\kappa$ B a través de la regulación del complejo I $\kappa$ B quinasa (IKK), en el que también intervienen los factores TRAF-2 y TRAF-6 (miembros de la familia del factor necrosante tumoral) (41, 57). Una vez unido PKR con TRAF es activado el complejo IKK, éste fosforila a la proteína inhibidora I $\kappa$ B, que en condiciones normales se halla unida al dímero NF- $\kappa$ B reteniéndole de manera inactiva en el citoplasma. La fosforilación en I $\kappa$ B posibilita su reconocimiento por el proteasoma, un complejo con diversas actividades proteasas responsable de la degradación de I $\kappa$ B. Una vez degradado I $\kappa$ B, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B queda libre y puede alcanzar el núcleo, regulando la expresión de diversos genes que intervienen en la respuesta inmunitaria, o decidir el destino (muerte o supervivencia) de las células. Así, la función de la proteína PKR no abarca sólo la regulación de la traducción, sino tam-

bién la de la transcripción. Aunque el papel esencial de NF- $\kappa$ B es inducir la transcripción de genes de defensa, su activación por PKR va a inducir también la transcripción de genes pro-apoptóticos, un concepto que fue difícil de asumir hasta que publicamos nuestras observaciones en 1999.

Además de NF- $\kappa$ B, otros investigadores han observado que PKR fosforila también a la proteína quinasa 6 activada por mitógenos, MKK6, a los factores nucleares asociados con RNA bicatenario, llamados NFAR, y regula a la proteína quinasa p38, MAPK. Otra molécula que interacciona con PKR es el producto del gen asociado a diferenciación de melanoma (mda-7, también llamado IL-24), un potente supresor de tumores; esta interacción conlleva a la inducción de apoptosis. Además de estas interacciones, PKR juega un papel relevante en cascadas de señalización involucradas en muerte celular, como STAT-1, p53, ciclina B1, PDGF, IRF-1, ASK-1 (39). Entender cómo la PKR provoca la muerte celular por apoptosis lo discutiremos a continuación, pues esta demostración ha sido una contribución importante de mi grupo de investigación en una serie de trabajos que publicamos entre 1994 y 2005 (40-49, 54, 57-59).

### C.6. *Inducción de apoptosis por la proteína quinasa PKR*

En nuestro laboratorio, descubrimos en 1994, que el gen de la proteína quinasa PKR era capaz de inducir la muerte celular programada o apoptosis, lo que explicaba la acción antiviral y antitumoral de los IFNs (47). La apoptosis es un programa genético de muerte celular. Presenta características propias: condensación y fragmentación del DNA, de distintos orgánulos y de la membrana plasmática, descomposición de la célula en vesículas, cuerpos apoptóticos y disgregación nuclear. La apoptosis desempeña una misión importante en diversos aspectos de la vida, que van desde el desarrollo embrionario hasta el día a día del organismo; elimina células no funcionales, dañinas, peligrosas, o simplemente producidas en exceso. La inducción de apoptosis podría ser, sugeríamos entonces, un mecanismo que ligase la quinasa PKR con su capacidad antiviral (sirviendo para librar al individuo de células infectadas por virus) y antitumoral (contribuyendo a la eliminación de células tumorales).

La apoptosis se pone en marcha mediante la activación proteolítica en cascada de las caspasas, una familia de proteasas, que se encuentran en las células en un estado inactivo (60). Existen dos cascadas principales, una desencadenada en respuesta a señales paracrinas o autocrinas provocadas por ligandos y receptores de la familia del factor necrosante tumoral (TNF), y otra causada por diversos estímulos lesivos de la mitocondria, que convergen en la activación de las caspasas efectoras, 3, 6 y 7 (60-68).

La ruta inducida por ligandos de la familia del TNF empieza mediante la oligomerización de los receptores de la familia del TNF (o receptores de la muerte), que reclutan a diversas moléculas adaptadoras. El objetivo final es la captación y autoprocesamiento de la caspasa 8, que se activa así y permite el procesamiento de las demás caspasas. En la otra gran vía de inducción de apoptosis intervienen diversas señales que acaban convergiendo en la mitocondria. El daño producido en el orgánulo provoca la liberación al citoplasma de moléculas diversas. Por ejemplo, del citocromo C, que puede unirse y activar a APAF-1, una molécula citosólica adaptadora. El complejo resultante APAF-1/citocromo C puede incorporar y activar a la caspasa 9, que pone en marcha la activación de las caspasas efectoras.

Durante los últimos años nos hemos centrado en el mecanismo de inducción de apoptosis por la enzima PKR. Mediante el uso de mutantes dominantes negativos específicos para la vía de fosforilación de eIF-2 $\alpha$  o de inducción de NF- $\kappa$ B, hemos comprobado que ambas rutas están implicadas en la apoptosis promovida por PKR. De ello se desprende que, a través de la regulación de la traducción y de la transcripción, la proteína PKR modula la expresión de un conjunto de genes que desembocan en la inducción de apoptosis.

El análisis de los mecanismos implicados en la muerte celular programada debida a la enzima PKR nos ha llevado a descubrir que la caspasa 8 constituye la proteasa clave de este proceso (43, 54, 68). La caspasa 8 se activa durante la apoptosis, inducida por PKR, en presencia de la molécula adaptadora FADD, un mediador común utilizado por diversos receptores de la familia del receptor TNF. Sin embargo, en el caso de la apoptosis inducida por la quinasa PKR, parece que la activación de la molécula FADD no depende de los receptores TNF, sino de un mecanismo atípico (aún por descubrir el receptor), similar

al observado recientemente para la apoptosis derivada del tratamiento con cicloheximida, del estrés de radiación ultravioleta o del tratamiento con agua oxigenada. Los resultados obtenidos hasta la fecha sitúan a la enzima PKR como un mediador destacado de diversos procesos biológicos. Activada por múltiples estímulos, regula la síntesis de proteínas y la transcripción de genes específicos que determinan la pervivencia o muerte celular.

El entendimiento de cómo PKR regula el crecimiento y muerte celular puede proporcionar nuevas oportunidades terapéuticas dirigidas a combatir procesos infecciosos, tumorales y enfermedades neurodegenerativas, mediante el diseño de fármacos que activen o repriman la acción de PKR (69, 70). Estas investigaciones están en marcha en nuestro laboratorio.

#### C.7. *El sistema de 2-5A sintetasa/RNasa L como antiviral y antitumoral de los interferones*

Como hemos dicho, las acciones del IFN se deben a múltiples genes. En el caso de su misión antivírica intervienen además múltiples vías. Una de estas vías es el sistema de la 2-5 A (71). Se trata de una ruta multienzimática, compuesta por tres sintetetas (AOS1-OAS3) cuya transcripción se induce por IFNs, y una endoribonucleasa, la RNasa L (72-74). Igual que acontecía con la enzima PKR, la eficacia de este sistema contra las infecciones víricas depende de la capacidad que las 2-5A sintetetas posean de activarse en respuesta a la presencia de RNA bicatenario.

Una vez activadas, las 2-5A sintetetas intervienen en la síntesis de 2'-5' oligoadenilatos utilizando ATP, unos ácidos nucleicos peculiares y únicos en la naturaleza, pues los oligómeros de ácido adenílico [ $x5'A (2'p5'a)_n$ , donde  $x = 1-3$  y  $n > 2$ ] tienen la unión 2'-5' en lugar de la 3'-5', característica de las moléculas de RNA. Compete a los oligoadenilatos unirse, provocar la dimerización y poner en funcionamiento a la RNasa L, que se encuentra latente en las células y es un enzima único de 83 kDa. El gen humano de RNasa L (*RNASEL*) se localiza en el cromosoma 1q25, el locus HPC1 (*the hereditary prostate cancer 1 gene*) (75, 76). La RNasa L activada causa la degradación masiva de

RNA mensajero (víricos y celulares) y de RNA ribosómicos, con la inhibición consiguiente de la síntesis de proteínas en las células infectadas y la apoptosis de éstas, que explicaremos enseguida. Semejante sistema ha demostrado tener una notable capacidad antiproliferativa y antivírica contra el VIH, el virus *vaccinia*, el virus EMCV y el virus de Coxsackie.

En el año 1997 demostramos que la RNasa L también poseía capacidad inductora de apoptosis, lo que ponía sobre el tapete la redundancia en las acciones ejercidas por los IFNs (77, 78). Otros grupos revelarían luego que ambas enzimas (PKR y RNasa L) intervenían en la apoptosis inducida por causas muy diversas, además de controlar la infección viral (79). Para obtener más información sobre los mecanismos moleculares por los que RNasa L induce apoptosis, hemos generado vectores que expresan tanto la RNasa L como la 2-5 oligoadenilato sintetasa y demostrado en células en cultivo que la RNasa L induce apoptosis por activación de caspasas 2, 8, 9 y que la activación de la RNasa L es un evento que ocurre antes de la aparición de apoptosis y que requiere la acción de la mitocondria. En esencia, hemos demostrado recientemente que la activación de la 2-5A sintetasa por RNA bicatenario viral produce los oligonucleótidos 2-5 A que activan a la RNasa L, lo que produce una degradación del RNA celular, antes de que se induzca la apoptosis. Al comienzo de la apoptosis, tanto la RNasa L como la 2-5A sintetasa se localizan en el citoplasma y en la mitocondria, pero al iniciarse la apoptosis, ambas enzimas se trasladan a la mitocondria. Como consecuencia de la activación de RNasa L se produce la degradación de RNA, con la consiguiente inhibición en la síntesis de proteínas que, directa o indirectamente, activa a las caspasas. La activación de las caspasas 2, 8, 9 provoca la rotura de sustratos apoptóticos, dando lugar a una acción orquestal del programa de muerte celular. Una vez que las caspasas se han activado, la mitocondria sufre cambios morfológicos y fisiológicos caracterizados por la liberación de citocromo C al citoplasma, pérdida del potencial de membrana, así como la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS), con el resultado final de muerte por apoptosis (Domingo-Gil, E. and Esteban, M., *Apoptosis*, en prensa, 2006).

La importancia del sistema RNasa L en defensa viene reflejado por los estudios recientes que han observado que la RNasa L está involucrada en ciertos tumores de cáncer de próstata, al producirse mutacio-

nes en el gen celular *RNASEL* que alteran la actividad de la enzima (76). Está claro que la mitocondria juega un papel central en apoptosis a través de mecanismos interrelacionados que provocan alteraciones en el transporte de electrones, fosforilación oxidativa y producción de ATP, junto con liberación de proteínas que inducen activación de la familia de proteasas, las caspasas, y alteración del potencial Redox de reducción oxidativa.

### C.8. *Evasión de los virus a la acción de los genes de defensa inducidos por los interferones*

Teniendo en cuenta que el IFN constituye la primera línea de defensa del organismo para luchar contra infecciones virales (16, 80), no es sorprendente que los virus hayan desarrollado estrategias para evadir la acción del IFN. En trabajos pioneros propusimos en 1984 (81) que la resistencia del virus vaccinia al IFN era debida a la inducción de genes virales específicos que contrarrestaban el efecto de las enzimas 2-5A sintetasa y de la proteína PKR. En estos últimos años se ha demostrado la existencia de genes de poxvirus capaces de bloquear la acción del IFN a varios niveles (82, 83). Así, se han identificado productos de genes del virus vaccinia que son análogos al receptor del IFN de tipo I (gen B18R), y al receptor del IFN de tipo II (gen B8R). Dichos productos víricos son liberados al medio extracelular por las células infectadas y compiten con los receptores celulares en su unión a los IFNs. Asimismo, los productos de los genes E3L y K3L del virus *vaccinia* interfieren con la acción de los IFNs. El gen E3L codifica para una proteína de 25 KDa que se une específicamente al RNA bicatenario. Esta proteína de 25KDa compete con la PKR y la 2'-5'-A oligoadenilato sintetasa por el ligando, restringiendo su activación y por lo tanto la inhibición de la traducción (84-87). El segundo producto vírico que interfiere con la acción del IFN es el codificado por el gen K3L (88). Este gen expresa un polipéptido de 10.5 KDa que en su región carboxi-terminal presenta una gran homología con el factor de iniciación eIF-2 $\alpha$ . De una forma similar al caso anterior, la proteína vírica 10.5 KDa compete con el factor de iniciación eIF-2 $\alpha$  como sustrato para la proteína PKR. El resultado es una disminución en la fosforilación del factor eIF-2 $\alpha$  y por lo tanto una disminución en el bloqueo de la traducción.

A raíz del descubrimiento con los Poxvirus de la presencia en su genoma de genes que interferían con la acción de los IFNs, posteriormente se demostró en otros virus animales la existencia de genes virales capaces de interferir con la acción del IFN, y mayoritariamente dirigidos contra la enzima PKR (26, 80). Así, en adenovirus, el gen VA1-RNA (160 nucleótidos) bloquea la activación de la PKR. En el virus Epstein-Barr, los genes EBER1 y EBR2 actúan como VA2 de adenovirus. La proteína NS1 del virus de la gripe previene la activación de PKR. Asimismo, el virus de la polio provoca la degradación de PKR durante la infección. El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) tiene dos elementos reguladores de la proteína PKR, la secuencia TAR que activa y la proteína TAT que inhibe la acción de PKR. En reovirus la proteína  $\sigma 3$  actúa como un inhibidor de PKR por unión de RNA bicatenario. El virus de la hepatitis C codifica por dos proteínas: una es E2, que es un pseudosustrato y actúa como un inhibidor competitivo de la actividad PKR sobre el factor eIF-2 $\alpha$ , y la otra es NS5A involucrada en unión a PKR e inhibición de su dimerización. En el caso del virus herpes, el principal antagonista de PKR es la proteína ICP34.5, que actúa por reclutamiento de una fosfatasa que defosforila eIF-2 $\alpha$ , mientras que otra proteína US11 de herpes, actúa por unión a RNA bicatenario, inhibiendo la acción de PKR.

Trabajos en mi laboratorio nos han permitido demostrar que la proteína E3L del virus *vaccinia* inhibe tanto a la acción de la proteína quinasa PKR como a la acción del sistema 2-5A sintetasa/RNasa L (45, 86). También hemos demostrado que otras proteínas virales inhiben la acción de la PKR, como son el producto del gen MC159L del virus *molluscum contagiosum* (89), la proteína A179L del virus de la fiebre porcina africana (90), el ORF5 del virus que produce el síndrome respiratorio reproductivo del cerdo (SRRC) (91). Recientemente hemos demostrado que la proteína LANA2 del virus humano herpes 8, causante del sarcoma de kaposi (HHV8), inhibe la acción de PKR (92). En un trabajo más reciente en *Genes and Development* (2006), hemos demostrado un nuevo mecanismo de evasión viral para los alfavirus (Sindbis y Semliki), por el que la forma subgenómica 26S mRNA viral con una estructura en forma de horquilla («hairpin loop») en su extremo 5' localizada después de la señal iniciadora AUG, sitúa al ribosoma en su lugar correcto permitiendo la iniciación en la síntesis de proteínas y así evitando a la acción de la proteína quinasa PKR, un fenómeno que

ocurre aún en presencia de niveles muy altos de fosforilación del factor de iniciación eIF-2 alfa.

La importancia biológica de PKR queda reseñada por el hecho de que se han identificado varias proteínas celulares que actúan como activadores o inhibidores de PKR. Entre los activadores está la proteína PACT/RAX (93) que se une a los dominios de unión de RNA bicatenario. Entre las proteínas celulares inhibidoras de la acción de PKR están p58-IPK (94) que se induce durante la infección con el virus de la gripe y por choque térmico; la proteína p67, que hemos demostrado se asocia a PKR e inhibe la fosforilación de eIF-2 $\alpha$  (42), y la proteína Tar, que se une a los dominios de unión de RNA bicatenario en PKR (26).

Mediante la utilización de ratones deficientes en PKR e infección con virus herpes o de la gripe carente en genes de interferencia con PKR, como ICP34.5 y NS1, se ha demostrado que esta enzima juega un papel fundamental en defensa del organismo contra infecciones. PKR parece que juega un papel importante en cáncer, ya que células que sobreexpresan un mutante dominante negativo inducen tumores en ratones desnudos (26, 39, 45).

En estudios recientes y en colaboración con los grupos de Manuel Serrano (CNIO) y de Carmen Rivas (Facultad de Farmacia, Universidad Complutense en Madrid) hemos identificado un nuevo mecanismo de acción de los genes supresores de tumores, como p53 y ARF, al actuar también como inhibidores de la replicación viral. La regulación de la replicación viral se produce por interacción de ARF con la proteína nuclear nucleofosmina; esta proteína normalmente se une a PKR y la bloquea. Durante la infección con un virus, se induce ARF que desplaza a la unión PKR-nucleofosmina, por lo que PKR, una vez liberada, se activa por RNA bicatenario viral con la consiguiente inhibición de la replicación viral. El impacto de la proteína quinasa PKR en procesos biológicos es el objeto de una revisión que estamos escribiendo para *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (2006).

C.9. *Hacia el descubrimiento de nuevos genes inducidos por las enzimas de defensa, PKR y 2-5A sintetasa/RNasa L*

Es indudable que los múltiples efectos asignados a las enzimas PKR y sistema 2-5A sintetasa/RNasaL no se deben a la contribución de un solo gen, sino a un complejo de genes. Aunque se ha implicado a varios factores transcripcionales como IRF-1, IRF-3 e incluso p53 en la apoptosis inducida por PKR, sin embargo no se conoce el conjunto de genes que se activan por PKR en un proceso de replicación vírica. Para identificar a los genes celulares que se inducen en respuesta a estas enzimas en la infección, hemos recurrido a la tecnología de «chips» de DNA que contienen más de 15.000 genes humanos. En un estudio reciente (Guerra y col., enviado a publicación), hemos observado que un total de 111 genes se regulan específicamente por la actividad catalítica de PKR, de los cuales la expresión de 97 genes está aumentada, mientras que la expresión de 14 genes está disminuida. Nueve de los genes activados codifican proteínas involucradas en adhesión celular, tres genes con papel de inmunomoduladores y 19 genes en metabolismo y señalización. Además, 21 genes están implicados en transcripción y 11 en traducción. La transcripción de los genes que codifican dos subunidades del proteasoma está también aumentada. La transcripción de genes con funciones de inhibición de la inducción de apoptosis por PKR, como las proteínas de choque térmico, la familia Hsp70 está reprimida. Entre los genes involucrados en apoptosis por la acción de PKR hemos identificado a la caspasa 9 y al factor transcripcional ATF-3. ATF-3 actúa como un sensor que interacciona con p53 en condiciones de estrés celular, bloqueando su ubiquitinización; también aumenta la actividad de la caspasa 3, y su sobreexpresión confiere actividad antitumorigénica, especialmente en cáncer colorectal. Las implicaciones biológicas de estos estudios es que alguna de las actividades antitumorales de los interferones deben de estar relacionadas con la expresión de ATF-3, por lo que este factor puede ser una buena diana para conocer la eficacia terapéutica en pacientes tratados IFN. La utilización de «chips» en combinación con ensayos genéticos y bioquímicos permitirá definir el papel de cada uno de los genes inducidos por PKR en el proceso de muerte celular por apoptosis y desarrollar estrategias que permitan su control.

En relación al sistema 2-5A sintetasa/RNasa L, hemos iniciado en el laboratorio la identificación por «chips» de los genes humanos induci-

dos durante el proceso de apoptosis que ocurre durante la infección con virus recombinantes de *vaccinia* que expresan RNasa L y la 2-5A oligoadenilato sintetasa.

#### C.10. *Aplicaciones clínicas de los interferones*

Conocer los mecanismos precisos de inducción de apoptosis por la quinasa PKR y otras proteínas inducidas por IFNs servirá para mejorar los tratamientos terapéuticos efectuados con los IFNs. La disponibilidad de diferentes tipos de interferones ha posibilitado la realización de una amplia serie de tratamientos clínicos en humanos. En ellos ha quedado patente su eficacia contra enfermedades víricas, tumores y enfermedades neurodegenerativas (95).

Los interferones se han hecho imprescindibles en oncología clínica. Se aplican en leucemias (mielocítica crónica, de célula pilosa), mieloma múltiple, linfoma non-Hodgkin, melanoma, carcinoma renal, sarcoma de Kaposi y papilomas. A ellos se recurre también en enfermedades de origen vírico (hepatitis B y C), síndrome agudo respiratorio, y se usan experimentalmente frente al VIH. Sin olvidar su aplicación creciente en enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple o esclerosis lateral amiotrófica (96). La combinación de los IFNs con otras terapias está contribuyendo a potenciar su actividad antiviral y antitumoral (97). Sin embargo, debido a los múltiples efectos que induce en una célula, no es sorprendente que estemos aún lejos de administrar estas moléculas de forma óptima, teniendo en cuenta las diferencias que se producen a nivel de expresión génica entre individuos. Por ello se está tratando de regular la acción de enzimas inducidas por los IFNs, como PKR, ya que en estudios recientes se ha observado su activación en varias patologías, como Alzheimer, Parkinson, Huntington y en la anemia de Fanconi. También se ha correlacionado el cáncer de próstata con la activación de RNasa L. Así pues, se inicia una nueva era en medicina clínica dirigida a activar o inhibir la acción de genes inducidos por los IFNs, con la finalidad de optimizar la aplicación terapéutica de estas moléculas biológicas tan potentes.

Resulta gratificante para quienes trabajamos en el campo de los interferones observar cómo, después de casi 50 años, lo que se alegó era

un artefacto, ha resultado ser una realidad que alivia y controla distintas patologías. El conocimiento del amplio espectro de genes inducidos por los interferones por técnicas de «biochips», y el ahondar en las implicaciones funcionales de cada uno de ellos, servirá en un futuro para racionalizar las terapias. Todas estas aplicaciones clínicas se fundarán, como ha ido ocurriendo hasta ahora, en el avance de la ciencia básica y clínica.

Aunque el papel inicial asignado a los IFNs fue su acción antiviral de amplio espectro, inhibiendo tanto a virus RNA como DNA, sin embargo hemos comprobado que estas moléculas juegan un papel esencial en la activación de la respuesta inmune. Hoy en día se está combinando a los IFNs y otras citoquinas con adyuvantes y vacunas para potenciar la respuesta inmune frente a determinados antígenos y expandir la población de células B y T protectoras. Así pues, la segunda parte de mi discurso versará sobre la utilización de vacunas como complemento a los IFNs y como estrategia para aumentar las defensas del organismo en contra de patógenos y tumores. Una de las vacunas más eficaces ha sido la usada contra la viruela. Actualmente, recombinantes basados en el virus vacunal se están utilizando como vacunas contra otras enfermedades. Describiré a continuación los logros alcanzados con el virus vacunal, así como futuras aplicaciones.

#### **D) Las vacunas como segunda línea de defensa del organismo**

Hemos descrito a los IFNs como primera línea de defensa del organismo contra agresiones externas, como son los patógenos, y mencionado al principio que además de esta barrera el organismo dispone de otra que requiere más tiempo para su activación. Se trata de la respuesta inmune humoral y celular, que actúa como segunda línea de defensa contra los patógenos y que su activación por procedimientos de vacunación ha permitido controlar globalmente a grandes enfermedades.

### D.1. *Descubrimiento del proceso de vacunación: la erradicación de la viruela*

La erradicación de la viruela en 1980, la más devastadora de todas las enfermedades de la especie humana, afectando a una décima de la población mundial, fue posible gracias al programa de vacunación masivo coordinado por la OMS, y ha constituido uno de los mayores logros sanitarios a nivel mundial (98-103). Ha sido la primera enfermedad erradicada de nuestro planeta. Hay que considerar que sólo en el siglo xx sucumbieron a esta enfermedad más de 300 millones de personas. Las razones del éxito del programa fueron las siguientes: el huésped de la viruela es el hombre, sólo hay un serotipo, no produce infección persistente, se puede diagnosticar tempranamente, la enfermedad es localizada, las manifestaciones subclínicas no son fuente de contagio, la vacuna confiere protección duradera, es barata y estable, y no hay barreras culturales o sociales frente a la infección.

El éxito de la vacunación obviamente no hubiera sido posible sin la contribución de quien descubrió la vacunación contra la viruela mediante la inoculación de material aislado de la ubre de las vacas que producía lesiones en las manos de las personas que las ordeñaban. Fue esta observación la que utilizó el médico inglés Edward Jenner para demostrar en 1796 que de la lesión producida en las manos de Sarah Nelmes (una ordeñadora que se había contagiado con la enfermedad de la uvre de las vacas, llamada Cow-pox), se podía extraer un material que al ser introducido por escarificación en el brazo del niño de ocho años James Phipps, se producía una protección contra la viruela, como lo demostró por posterior inoculación al niño de material obtenido de pústulas de personas infectadas con viruela. Este proceso lo repitió con otros 23 casos, consiguiendo la protección total contra la viruela (102, 103). Los resultados de estos trabajos de vacunación los publicó Jenner en un libro en 1798, ya que no le permitieron su publicación en la revista científica *Transactions of the Royal Society*. Este es un ejemplo típico de lo difícil que es introducir nuevos conceptos en la sociedad científica y transgredir moldes previamente establecidos (104). Se le acusó jocosamente a Jenner de convertir a las personas inoculadas con material de las vacas en monstruos con cabeza de vaca. El proceso de vacunación masiva lo aplicó el médico español Francisco Javier Balmis que, utilizando el método de Jenner, inició una expedición en 1803 a las

colonias españolas de ultramar y consiguió vacunar hasta 1810 a unas 500.000 personas. La expedición de Balmis a América Central y del Sur, así como a Filipinas, auspiciada por la Corona española, ha sido uno de los acontecimientos más relevantes en la historia de la conquista de la viruela (aunque poco divulgado), y una gran aportación de la medicina española a la lucha contra enfermedades (105). Como investigador que lleva trabajando más de treinta años en la biología del virus que fue utilizado como vacuna contra la viruela, me produce un gran orgullo recuperar la memoria histórica de Balmis. La expedición y vacunación en masa en zonas con alta mortandad por viruela es el claro ejemplo de solidaridad entre los pueblos, a lo que Balmis contribuyó de forma decisiva.

El hito histórico de la erradicación de la viruela se ve agravado por el peligro de que la viruela vuelva a emerger por medio de actos terroristas (106). Afortunadamente, en el mundo sólo se puede trabajar con el virus de la viruela en dos centros, el Centro de Enfermedades Infecciosas de Atlanta, en EE.UU., y el Centro Vector en Novosibirsk en Rusia. La investigación que se realiza en ambos centros con el virus de la viruela está bajo control de la OMS, con asesoramiento de un Comité de expertos internacionales, entre los que me encuentro. Existe una moratoria de la OMS para destruir la colección de virus de la viruela existentes en EE.UU. y Rusia, tan pronto como se considere que se han desarrollado métodos de diagnóstico, drogas antivirales y vacunas de nueva generación con menos efectos secundarios, que garanticen totalmente el control de la infección en el caso de que la viruela pudiera re-emerger, bien por bioterrorismo o a través de la infección por virus muy relacionados, como la viruela de monos.

El interés por seguir estudiando el virus de la viruela y los miembros de la familia Poxvirus a la que pertenece, estriba en la carencia de conocimiento que se tiene acerca de cómo este virus produjo una enfermedad tan letal y, por otro lado, en la posibilidad de utilizar los Poxvirus como herramientas para producir vacunas contra otras muchas enfermedades humanas y animales. Analizaremos aspectos relevantes sobre el virus y su uso como vacuna.

## D.2. Características de los Poxvirus

Los Poxvirus forman la familia más compleja de virus animales con DNA, encontrándose ampliamente distribuidos en la naturaleza (107). La familia *Poxviridae* está dividida en dos subfamilias, *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae*, dependiendo de si el rango de hospedador son vertebrados o insectos. La familia *Chordopoxvirinae* está compuesta por ocho géneros: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus* and *Yatapoxvirus*. Los miembros de un mismo género están antigénica y genéticamente relacionados, teniendo una morfología semejante. La subfamilia de *Chordopoxvirinae* infecta a numerosas especies, como ratón, conejo, cerdo, cabra, vaca, camello, búfalo, elefante, mono y hombre, y la subfamilia *Entomopoxvirinae* a una gran variedad de insectos. La enfermedad *mixomatosis* producida por miembros del género *Leporipoxvirus* es prevalente en Europa, con un alto índice de mortandad. De hecho esta propiedad la utilizó el investigador Frank Fenner para llevar a cabo el primer experimento de control biológico con la introducción de la mixomatosis europea en animales de campo en Australia para evitar una excesiva multiplicación de conejos.

Solamente los miembros del género *Orthopoxvirus* y *Molluscipoxvirus* infectan a la especie humana, aunque los Poxvirus de oveja, cabra y vaca pueden infectar a humanos por contacto directo con lesiones. Aunque la viruela causada por *variola major* ha sido erradicada, sin embargo los demás miembros de Poxvirus se mantienen en la naturaleza infectando a sus hospedadores. De hecho, en el año 1970 se identificaron los primeros casos humanos de infección por el virus de los monos (*monkeypox*) y el número de casos ha ido en aumento con más de 500 descritos desde 1996, aunque no hay evidencia de que la infección por *monkeypox* produzca una enfermedad como la viruela. Más de 30 casos de infección en humanos por *monkeypox* se han dado en EE.UU. en 2002 como resultado de la importación de roedores de África, afectando a diez Estados (108). La infección por *monkeypox* es zoonótica, probablemente se transmite por vía respiratoria, se asemeja a la viruela, pero difiere genéticamente y por las propiedades biológicas y epidemiológicas, con menores tasas de mortandaz, entre el 10-15 por 100 de los infectados. La secuenciación del genoma de *monkeypox* ha demostrado que no es un virus ancestral de viruela, sino una especie única.

Se han secuenciado los genomas de más de 50 aislados en distintos continentes obtenidos en personas infectadas con el virus de la viruela. Actualmente el diagnóstico epidemiológico de los Poxvirus se realiza por técnicas de ampliación génica por PCR/RFLP y su secuenciación nucleotídica, así como por diferencias en reactividad contra distintos anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra proteínas específicas. Hay que tener en cuenta que la población está desprotegida, puesto que la práctica de la vacunación contra viruela ha sido suspendida en todos los países. La mejor forma de prevención es disponer de todas las herramientas que permitan su control. Hoy en día existen muy pocos antivirales específicos contra Poxvirus, como los interferones, metisazona (N-metilisatin B-tiosemicarbazona), rifampicina, ribavirina, cidofovir y derivados cíclicos, pero su eficacia en humanos no ha sido demostrada (109). Mediante el conocimiento de la biología molecular de Poxvirus y análisis estructural se podrán diseñar compuestos con especificidad frente a proteínas esenciales en la cascada de replicación viral. Por motivos de seguridad, es necesario producir al menos tres compuestos que inhiban selectivamente más de un proceso replicativo viral (ejemplo, inhibidores de proteasa, de topoisomerasa, de DNA polimerasa, de morfogénesis, etc.).

El estudio de los Poxvirus ha permitido hacer avances importantes en inmunología y en biología celular. De hecho el nacimiento de la inmunología tiene sus bases en la vacunación contra viruela. Fueron los primeros virus en utilizarse como vacuna (frente a viruela), y el nombre de vacunación fue universalizado por Louis Pasteur por derivarse la primera vacuna de pústulas obtenidas en la ubre de las vacas (del latín *vacca* se derivó el nombre de vacuna) y extender, junto con Robert Koch, el término a la vacunación preventiva contra otros agentes. Fueron los primeros virus animales en ser visualizados microscópicamente, cultivados, cuantificados en células y definida su composición química. Además, los estudios bioquímicos sobre estos virus sirvieron para demostrar que los retrovirus contienen una enzima llamada reversa transcriptasa que otros virus con RNA en su genoma contenían la enzima RNA polimerasa, que les servía para copiar sus genomas, y que la mayoría de los RNA mensajeros (mRNA) virales y celulares contienen en su extremo 3' una secuencia de poli A (entre 50-200 residuos de adenosina) y en su extremo 5' una estructura llamada *cap* (m7GpppN). Toda la maquinaria enzimática necesaria para copiar el DNA a mRNA

(proceso de transcripción) se encuentra formando parte de la partícula viral (107). Estudios posteriores demostraron que esta familia de virus codifica una serie de genes cuya función es evadir la respuesta del sistema inmune frente a la infección (110). Estos mecanismos de evasión han sido posteriormente identificados en otros virus. Los Poxvirus también fueron los primeros virus animales en los que se demostró que en su genoma se podían incorporar genes de otras especies y producir virus recombinantes (111, 112). Estos virus recombinantes están siendo utilizados en fase experimental como posibles vacunas contra un amplio espectro de enfermedades humanas infecciosas y tumorales. Analizaremos a continuación la estructura del virion y su replicación en la célula infectada.

### D.3. *El ciclo replicativo de Poxvirus*

Las partículas virales tienen el mayor tamaño de los virus animales, entre 270-350 nm, pudiendo verse con el microscopio óptico. Básicamente, la infección se inicia con la unión del virus a la membrana celular por acción de varias proteínas virales, entrada del nucleoide viral («core») en el citoplasma, desnudamiento del «core» por mecanismos aún desconocidos, expresión génica, replicación del DNA y morfogénesis. El virus que contiene un DNA de doble cadena con los extremos sellados penetra por fusión de membranas, como lo demostramos hace bastantes años. Se libera el nucleoide («core») que sintetiza mRNA tempranos, seguido por la replicación concatemérica del DNA viral con síntesis de mRNA intermedios y posterior producción de mRNAs tardíos que requieren la cooperación de factores celulares para dar lugar a las proteínas estructurales. Se inicia el proceso de ensamblaje y formación de partículas infectivas (107).

A diferencia de otros virus, existen dos formas infectivas, llamadas virus intracelular maduro (IMV) y virus extracelular con envuelta (EEV) que se identifican claramente con el microscopio electrónico. Estas dos formas infectivas se diferencian en el número de membranas que adquieren del huésped. Así, en el proceso de formación del IMV, hay una serie de estadios intermedios que incluyen la adquisición de membranas del compartimento intermedio celular (ERGIC), formación de crestas con espículas, agrupamiento en partículas inmaduras (IV) que van

adquiriendo mayor densidad con la incorporación del DNA viral y su empaquetamiento. El DNA se incorpora a la partícula IV por un proceso todavía desconocido, probablemente a través de un poro. La incorporación secuencial de proteínas virales seguido del procesamiento proteolítico de proteínas del nucleoide, determinará la formación de la primera y más abundante forma infectiva viral, el virus intracelular maduro (IMV). Algunos de los IMV utilizan microtúbulos para llegar al área de Golgi y poder adquirir una segunda doble membrana, dando lugar a la partícula llamada virus intracelular con envuelta (IEV), que es transportado a la periferia de la célula por microtúbulos. En contacto con la membrana celular, la membrana externa del IEV se fusiona con la membrana plasmática y es liberado de la célula como virus extracelular con envuelta (EEV), que es la segunda forma infectiva viral (113). Muchas de estas partículas permanecen asociadas a la membrana celular, dando lugar a la formación de colas de actina que propelen al virus unido a la membrana hacia otras células donde inicia una nueva infección (114). La formación de colas de actina la inicia la proteína del virus *A36R* y está controlada por varias proteínas celulares como N-WASP, Nck, WIP y kinasas de las familias Src/Abl, entre otras (115).

En la membrana externa del EEV se encuentran seis proteínas virales que son únicas y que no se encuentran en el IMV. Estas proteínas son producto de los genes: hemaglutinina (*A56R*, gp86), *F13L* (p37), *B5R* (gp42), *A34R* (gp22-24), *A36R* (p45-50) y *A33R* (gp23-28). La delección de los genes *F13L* o *B5R*, así como la represión del gen *A27L* reduce de forma drástica la formación de IEV. El EEV representa menos del 1 por 100 del total de la progenie viral producida en la infección, pero participa de forma muy activa en la diseminación a larga distancia del virus en el huésped, mientras que el IMV juega un papel más importante en la transmisión del virus célula a célula.

Mediante crio-microscopía electrónica y reconstrucción tomográfica hemos definido la estructura del virus *vaccinia* en su forma infectiva de virus intracelular maduro o IMV (360 × 270 × 250 nm) con una resolución de 4-6 nm (116). Esta forma infectiva, que es la mayoritaria durante la infección, se caracteriza por tener una membrana externa lipídica (5-6 nm de grosor), debajo de la cual hay dos cuerpos laterales constituidos por material heterogéneo sin aparente estructura, y más

internamente existe un nucleoide o core rodeado por dos capas que tienen un grosor de unos 18-19 nm; la más externa de estas capas contiene proyecciones de espículas agrupadas en forma hexagonal, y la más interna es consistente con una membrana lipídica de 5-6 nm. En el core se observan poros que pueden servir para exportar el RNA mensajero durante el proceso de transcripción del genoma viral. Actualmente estamos tratando de definir la estructura del virus inmaduro (IV) para entender el proceso de organización de membranas en el virus.

Aproximadamente unas 100 proteínas forman parte de la estructura de IMV. En el proceso de maduración del IMV se piensa que sólo las proteínas virales forman parte del virión, aunque nuestros estudios de proteómica sobre la composición del IMV indican la presencia de algunas proteínas celulares. En el caso del EEV se ha demostrado la presencia de proteínas celulares, mayoritariamente receptores, que se incorporan a la membrana del EEV, debido al reclutamiento de la membrana del Golgi. El proceso replicativo dura entre las 12-24 horas, con producción de un gran número de partículas infectivas (unas 10.000 por célula), lo que nos da una idea sobre la capacidad infectiva del virus de la viruela.

#### D.4. *El genoma de Poxvirus*

Los Poxvirus contienen un genoma de DNA que varía en tamaño, desde 130.000 nucleótidos (caso de *Parapoxvirus*) a 300.000 nucleótidos (caso de *Avipoxvirus*). El primer genoma de Poxvirus se secuenció en 1990, teniendo el genoma del virus *vaccinia* estirpe Copenhague 191.636 pares de bases. Desde entonces se ha determinado la secuencia completa de unos 50 representantes de los distintos géneros de la familia Poxviridae (117). Una característica del genoma de Poxvirus es que la molécula de doble hélice del DNA tiene los extremos sellados covalentemente, por lo que en condiciones desnaturalizantes formaría un círculo. Las dos cadenas del DNA tienen en sus extremos una secuencia idéntica que está repetida pero opuestamente orientada, formando telómeros. Estos telómeros, que se mantienen conservados en todos los miembros de la familia, son ricos en secuencias A+T y no pueden formar una perfecta estructura apareada entre las bases. Hay una región adyacente al extremo de unos 100 pares de bases que es necesaria para

la resolución de las formas concatémicas del DNA en el proceso de duplicación. En los *Orthopoxvirus*, a continuación de esta región hay una serie corta de secuencias repetidas en tándem, separadas entre sí por segmentos homólogos de unos 250-350 pares de bases. El número de repeticiones varía entre miembros de la familia y en función del número de países. En los extremos se encuentran localizados la mayor parte de los genes no esenciales para la replicación viral y los que están involucrados en defensa viral, mientras que en las regiones internas del genoma abundan los genes que codifican proteínas estructurales (107).

Especialmente importante ha sido la obtención de la secuenciación completa de los genomas de *variola*, en sus formas virulenta (*variola major*) y atenuada (*variola minor o alastrin*), lo que ha permitido iniciar estudios de patogeneidad para entender por qué estos virus causaron tan alta tasa de mortandad en la población. La comparación entre las secuencias del virus *vaccinia* (con 185 posibles genes) y *variola* (con 186 posibles genes) ha permitido demostrar que ambos virus comparten 150 genes con una identidad del 90 por 100 (118). En comparación con *vaccinia*, *variola* tiene algunos genes truncados, otros fusionados y sus extremos codifican algunas proteínas únicas, aunque presentes en otros miembros de poxvirus. Los métodos actuales de secuenciación de genomas virales han reducido notablemente el tiempo en descifrar la secuencia de nucleótidos de un aislado viral, de un año en 1990 a unas cinco horas en 2005. El estudio de la funcionalidad de los genes de *variola major* aportará información relevante sobre la viruela.

#### D.5. Respuesta inmune frente a Poxvirus

La capacidad de los poxvirus por inducir una respuesta inmune protectora es conocida desde la antigüedad, con la práctica de la vario-lización (proceso utilizado en China basado en el uso de pústulas secas de pacientes infectados con viruela que se aplicaba a personas sanas). Esta práctica se utilizó de forma más segura por Jenner con la introducción de la vacunación a finales del siglo XVIII. La vacuna tradicional en humanos contra la viruela, basada en el virus *vaccinia*, se administraba por inoculación en la dermis con una aguja bifurcada conteniendo una suspensión del virus *vaccinia*, lo que daba lugar a una pápula a los 3-5 días y rápidamente se formaba una vesícula y luego una pústula que

alcanzaba su máximo tamaño a los 8-12 días. A continuación se formaba una costra que se separaba de la piel a los 14-21 días, dejando la típica señal epidérmica. Normalmente se produce una pequeña fiebre cuando aparece la pústula acompañada de hinchazón de los ganglios adyacentes. Ocasionalmente se produce viremia entre los 3-10 días y el virus se puede aislar de las amígdalas. En 1967 se inició una campaña de vacunación masiva de la población contra la viruela, utilizando como vacuna una estirpe del virus *vaccinia*. Esta campaña culminó en 1980 con la declaración por la OMS de la erradicación de la viruela de nuestro planeta (101). El éxito fundamental de esta campaña fue la existencia de una vacuna con capacidad para inducir una fuerte respuesta inmune que controlaba el proceso infeccioso.

Entre los mecanismos de inmuno-protección juegan un papel importante tanto la respuesta humoral, por activación de linfocitos B, como la celular, por activación de linfocitos T. La producción de anticuerpos neutralizantes del isotipo IgG e IgM es una característica de la infección y es fundamental en protección, como se ha demostrado mediante transferencia pasiva de inmunoglobulinas procedentes de animales vacunados a animales sanos y posterior inoculación de una dosis letal del virus *vaccinia*. En los individuos vacunados contra viruela se ha observado la persistencia de anticuerpos neutralizantes durante más de 20 años. Entre los antígenos de *vaccinia* que inducen anticuerpos neutralizantes están los productos de los genes *A27L*, *A33R*, *B5R*, *D8L*, *H5R* y *L1R*. Nuestro grupo fue el primero en demostrar protección frente al virus *vaccinia* con el antígeno purificado *A27L* (119). Por otro lado, la vacuna induce memoria inmunológica caracterizada por la activación de linfocitos T. Se ha observado con ratones a los que se les han inactivado genes del sistema inmunológico, o a los que se les han transferido células específicas, que la activación de linfocitos CD4+, CD8+ y de células asesinas NK es necesaria para la protección contra Poxvirus. A pesar de la multitud de antígenos virales, se conoce muy poco acerca de las proteínas que inducen una respuesta celular y menos aún sus dominios antigénicos. Estudios recientes indican que las células dendríticas juegan un papel importante en la presentación antigénica y en el establecimiento de la memoria inmunológica frente a Poxvirus (120, 121).

Además de la inducción de una respuesta inmune adquirida, que se produce entre unos tres días y dos semanas después de la inoculación

viral, la infección con Poxvirus induce una respuesta celular inmediata del huésped (respuesta innata), caracterizada por la producción de moléculas inmuno-moduladoras, como los interferones de tipo I y II, IL-12, TNF-alfa, Fas y otras. De hecho, con el virus *vaccinia* se demostró por primera vez que la producción de RNA bicatenario durante la infección era responsable de la producción de los interferones. Además, posteriormente se demostró que estas moléculas son potentes activadores de la apoptosis. El primer éxito terapéutico del interferón fue obtenido frente a lesiones oculares producidas por el virus *vaccinia* en conejo.

Con la implementación de la metodología de *microarrays* de DNA conteniendo 15.000 genes humanos, nuestro grupo ha identificado los genes celulares que se inducen o reprimen durante la infección con un Poxvirus (122, 123). Hemos demostrado que en el proceso de infección viral, la mayoría de los genes celulares activados por la infección se reprimen (en un 90 por 100), mientras que un número reducido de genes aumentan su expresión. Hemos identificado a uno de estos genes celulares de la familia WASP (síndrome de Wiskott-Aldrich) como necesario para la propagación del virus en tejidos animales, al estar implicado en la formación de colas de actina y propulsión del virus de una célula a otra (124). También hemos identificado a los genes celulares que se inducen cuando la infección es producida por virus atenuados derivados del virus *vaccinia*, como MVA y NYVAC, que infectan a las células humanas, pero son incapaces de propagarse (Guerra y col., 2006, en prensa). En este caso se pueden observar diferencias entre los genes que se inducen por la estirpe virulenta en relación con la atenuada, lo que tiene interés para el uso de estos virus como vacunas.

#### D.6. *Utilización de Poxvirus recombinantes como vacunas contra distintas enfermedades*

La demostración en 1982 por los grupos de Bernie Moss y de Enzo Paoletti en EE.UU. de que en el genoma del virus *vaccinia* se podían incorporar de forma estable una gran variedad de genes procedentes de otras especies y que por inoculación de estos virus recombinantes a animales se les podía conferir protección frente a un patógeno, supuso una revolución en el campo de las vacunas (111, 112). Por primera

vez se consideró que un Poxvirus se podría utilizar como posible vacuna contra otros patógenos, siempre y cuando no provocara efectos secundarios y dicha vacuna demostrara su eficacia. Además, la experiencia de campo acumulada con la práctica de la vacunación contra viruela hacía posible que vacunas basadas en Poxvirus pudieran tener una amplia distribución mundial.

Los fundamentos para producir un Poxvirus recombinante se basan sencillamente en generar un plásmido de inserción que contiene el gen de interés flanqueado por regiones codificadoras de un gen no esencial del Poxvirus, como el gen timidina quinasa o hemaglutinina y un gen marcador, como la  $\beta$ -galactosidasa o la proteína verde fluorescente (GFP). El gen de interés tiene su expresión controlada bajo un promotor fuerte que se activa a tiempos tempranos y tardíos en la infección. Mediante un proceso de infección de células animales en cultivo con un Poxvirus seguido de la introducción del plásmido de inserción por transfección, se produce durante unas 24 horas un proceso de recombinación específica de secuencia entre las regiones flanqueantes del plásmido de inserción y el locus homólogo del gen viral. El aislamiento de virus recombinantes se realiza por seguimiento del gen marcador que, si es  $\beta$ -galactosidasa, se detecta por la producción de placas de color azul en presencia de su sustrato, o si es GFP, por la fluorescencia verde. Existe una gran variedad de marcadores, tanto enzimáticos como antibióticos para la selección de virus recombinantes (125). Para el uso de estos vectores, como vacunas en humanos, se requiere que el gen marcador no esté presente en el virus recombinante, por lo que en estos casos se utilizan plásmidos en los que el gen marcador se elimina por recombinación homóloga entre los sitios flanqueantes.

El éxito de la utilización de vacunas basadas en Poxvirus recombinantes se demostró en los estudios de campo llevados a cabo en Europa y EE.UU. con un virus recombinante de *vaccinia* que expresaba la proteína de la envuelta del virus de la rabia. Se observó que la administración de esta vacuna en cápsulas comestibles inducía una respuesta inmuno-protectora contra la rabia en animales que transmiten la enfermedad, como el zorro (126). De esta forma se ha generado una gran variedad de virus de Poxvirus recombinantes contra enfermedades virales (gripe, encefalitis, enteritis, fiebres hemorrágicas, hepatitis, sida), bacterianas (neumonías), parasitarias (malaria, leishmania), tumorales

(melanoma, adenocarcinoma, tumor prostático), que se encuentran en fase de experimentación clínica.

Para evitar algunos efectos no deseados que se observaron en las campañas de vacunación contra la viruela, se han generado virus recombinantes altamente atenuados y seguros para la vacunación contra patógenos y tumores (127-129). Uno de los candidatos que está en experimentación clínica en fase I/II es el virus *vaccinia* modificado de Ankara (MVA), que fue obtenido después de más de 500 pases seriados en células primarias de embrión de pollo y que fue administrado a más de 120.000 personas en Alemania durante la campaña de vacunación contra la viruela. Estudios recientes han demostrado que la inoculación de MVA recombinante que expresa antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) confiere protección contra la enfermedad producida en simios por un híbrido (SIVH) del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) conteniendo antígenos del VIH. Actualmente hay una serie de ensayos clínicos en humanos contra la malaria, sida y tumores, utilizando virus recombinantes de MVA en combinación con otros vectores.

Estudios pioneros de vacunación frente a malaria, en los que participó nuestro laboratorio junto con los grupos de Ruth Nussenzweig y Fidel Zavala en New York University Medical Center y de Peter Palese en Mount Sinai de NY, demostramos en una serie de publicaciones que se podía expandir la población de células T CD8+ específicas para el antígeno CS (circunsporozoito) por administración sucesiva de dos vectores y que el orden de administración era fundamental para obtener protección frente a *Plasmodium yoelii* (130). Establecimos que si se lleva a cabo un protocolo de inmunización con una primera inoculación de un vector del virus de la gripe (influenza) que expresa el epítipo de CS específico para células T CD8+, seguido al cabo de dos semanas por una segunda inoculación con un vector de Poxvirus (*vaccinia* o MVA) que expresa la proteína completa CS, se produce al cabo de diez días una ampliación de la respuesta celular CD8+ específica frente a CS que induce protección (90 por 100) frente a la forma infectiva del parásito, esporozoitos de *Plasmodium yoelii* que producen la malaria murina. La protección se correlacionó con un alto grado de respuesta celular específica contra la proteína del circunsporozoito (CS) de plasmodio. Demostramos que este procedimiento de inmunización combinada de dis-

tintos vectores (*prime/booster*) inducía una respuesta inmunológica de tipo Th1 (caracterizada por la producción de las citoquinas IFN-g y IL-12), manteniendo la presencia de linfocitos citotóxicos CD8+ durante largos períodos de tiempo que aún protegían (en un 60 por 100) contra malaria (131, 132). Este procedimiento de *prime/booster* para expansión de células CD8+ ha sido confirmado por otros grupos utilizando como primera inoculación vectores que pueden ser DNA, proteínas, pseudopartículas, o virus atenuado expresando el gen de interés, seguido de una segunda inoculación con un MVA recombinante que expresa el mismo gen. Estos protocolos de *priming/booster* están siendo aplicados a otros sistemas de vacunación contra patógenos y ampliamente aceptados como regímenes de inmunización eficaz. Estos resultados han servido para aumentar el interés de los Poxvirus como vacunas, ya que el proceso de *priming/booster* con vectores heterólogos ha demostrado su eficacia en distintos modelos animales. Además, recientemente hemos demostrado que es posible inducir una fuerte respuesta inmune en mucosas frente a antígenos del VIH mediante la inoculación por vía respiratoria de recombinantes del virus de la gripe y de MVA (133).

¿Qué ocurre en el proceso de *prime/booster*? Hemos propuesto que durante la primera inoculación (*priming*) se produce una activación moderada de linfocitos T CD8+ específicos frente a unos pocos epítopos del antígeno, y que después de la segunda inoculación con el Poxvirus recombinante (*booster*) expresando el mismo antígeno, se produce una expansión de la población de células T CD8+, además del efecto *priming* en células inmunológicamente vírgenes. Las células que fueron activadas en la fase inicial reaccionan más rápidamente y se expanden. Actualmente el grupo que lidera el español Pedro Alonso está llevando a cabo ensayos clínicos en Mozambique con una vacuna basada en la proteína CS fusionada al antígeno de la hepatitis B junto con un adyuvante, obteniendo un 50 por 100 de protección frente a casos de malaria en la población de niños menores de cinco años. Es predecible que estos porcentajes puedan ser aumentados por inmunización de distintos vectores expresando el mismo antígeno o con una combinación de otros antígenos de Plasmodium.

Lógicamente cuando se utilizan vectores virales se produce una respuesta inmune frente al vector que reduce su capacidad inmunogénica cuando se utiliza el mismo vector como *booster*. La respuesta

inmunológica que se produce frente al vector se puede evitar mediante el uso de vectores basados en géneros de Poxvirus distintos, ya que hay una pobre reactividad cruzada entre ellos. Esta respuesta inmune frente al propio vector está disminuida en mutantes cuya replicación en células humanas se limita a la fase temprana, como avipoxvirus, o que sólo completan un ciclo de replicación sin progenie como MVA. Es predecible que en pocos años se utilicen vacunas basadas en vectores de Poxvirus contra una gran variedad de enfermedades.

Actualmente hay una serie de ensayos clínicos basados en Poxvirus recombinantes contra distintas enfermedades. En el caso del SIDA, hay varios ensayos clínicos que utilizan vectores recombinantes basados en virus atenuados de *vaccinia* que contienen múltiples deleciones en el genoma viral como MVA y NYVAC, o virus de canarios y pollos que no producen progenie en células humanas (para información adicional ver <http://chi.ucsf.edu/vaccines>). Nuestro laboratorio participa en el proyecto europeo de desarrollo de una vacuna contra el SIDA ([www.eurovacc.org](http://www.eurovacc.org)), para lo cual hemos generado y patentado virus recombinantes de MVA que expresan en un mismo locus viral los genes *env/gag-pol-nef* del VIH procedente de aislados europeo (serotipo B) y asiático (serotipo C), cuyos ensayos clínicos en fase I se iniciarán en 2006 (subtipo B) y 2007 (subtipo C). En los próximos años conoceremos la eficacia de la vacunación utilizando Poxvirus recombinantes, administrados solos o en asociación con otros vectores.

#### D.7. *Hacia una nueva generación de vacunas basadas en Poxvirus*

Debido a que la familia de Poxvirus codifica por proteínas que interfieren con el sistema inmune para evadir las defensas del organismo (110), es importante mejorar la capacidad inmunogénica de estos vectores y producir vectores de nueva generación con mayor capacidad para estimular respuestas inmunes frente al antígeno recombinante. Los vectores como MVA carecen de varias proteínas inmunomoduladoras, pero aún contienen otras capaces de contrarrestar el sistema inmune. Si queremos hacer uso óptimo de estos vectores es necesario eliminar estos genes o añadir otros que co-faciliten dicha respuesta. Nuestro grupo ha demostrado que se puede mejorar el comportamiento del vector MVA frente al VIH mediante la incorporación en el genoma viral

de genes inmunomoduladores, como las citoquinas IL-12, IFN-gamma y el factor GM-CSF. En el proyecto europeo del que soy coordinador, tenemos como objetivo el identificar los genes de MVA que una vez deletados produzcan un incremento de la respuesta inmune frente a recombinantes de dicho vector.

Los mecanismos inmunológicos que determinan la expansión de las células T CD8+ en el proceso de priming/booster con recombinantes del virus *vaccinia* no se conocen. Se acepta que durante la primera inoculación (*priming*) con un vector (DNA, VLPs, proteína, virus recombinante no relacionado con poxvirus) se produce una moderada activación de células CD8+ producido por pocos epítomos pero que después de la segunda inoculación (*booster*) con un recombinante de *vaccinia* expresando el mismo antígeno, se produce una fuerte expansión de la población de células CD8+ específicas, además del efecto *priming* en activación de células vírgenes (*naive*). Las células de memoria activadas inicialmente reaccionan y se expanden más rápidamente. Este potente efecto de expansión mediado por recombinantes de *vaccinia* puede estar relacionado con moléculas virales que inducen inmunomoduladores. Así, en experimentos de análisis por «microarrays» del patrón de expresión de genes celulares humanos después de la infección con vectores de MVA y NYVAC, hemos identificado genes celulares que se inducen por estos virus y que están involucrados en respuesta inmune, proliferación, apoptosis y migración (122).

Aunque los Poxvirus codifican por un buen número de proteínas que controlan el sistema del complemento, interferones y otras citoquinas y quimoquinas, es probable que muchas de estas moléculas modulen, en alguna medida, la acción del sistema inmune (134). En el caso de MVA, el genoma de este virus no contiene receptores solubles de citoquinas, como IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF o la proteína que se une a quimoquina. Hemos propuesto que para una mayor eficacia de *vaccinia* como vacuna es necesario inactivar selectivamente inhibidores virales de la función del sistema inmune o incorporar citoquinas en el genoma del virus (135). De esta forma se podrá modular la respuesta inmune frente a antígenos que son específicos. Nuestro laboratorio ha demostrado que esta segunda aproximación es eficaz, al observar que la expresión de IL-12 puede modular de forma positiva o negativa (por producción de óxido nítrico) la expansión de células T CD8+ específicas frente a la

proteína env del VIH (136). Utilizando IL-12 hemos establecido un protocolo de inmunización combinada de *prime/booster* con DNA y un recombinante de *vaccinia* expresando ambos la proteína env de VIH que aumenta fuertemente la producción de células T CD8+ específicas para VIH. Debido al papel tan importante que tiene IL-12 en la regulación del sistema inmune, polarizando el sistema hacia el subtipo Th1 y a su interés en terapias antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras, y al efecto sinérgico que IL-18 ejerce sobre IL-12 en protección (137), estamos llevando a cabo un estudio sobre optimización del uso de estas citoquinas en protección frente patógenos en modelos animales. También estamos inactivando de forma selectiva genes de MVA y de NYVAC que codifican por citoquinas, quimoquinas, TLRs, apoptosis y que definen el rango de hospedador, para usarlos como vectores vacunales contra distintas patologías, como SIDA y leishmaniosis.

En función de todo lo mencionado anteriormente y de la experiencia acumulada del laboratorio en el desarrollo de estrategias de inmunización frente a patógenos, especialmente frente a malaria, VIH y Leishmania ([www.cnb.uam.es](http://www.cnb.uam.es)), y la posibilidad de llevar a cabo los primeros ensayos clínicos con alguno de los inmunógenos generados por nosotros (caso de recombinantes de MVA que expresan en un mismo locus los genes env/gag-pol-nef del VIH-1, subtipos B y C), nos hemos propuesto, como continuación a nuestras investigaciones, llevar a cabo un estudio detallado de optimización y caracterización de la respuesta inmune por vectores de las cepas atenuadas de *vaccinia* MVA y NYVAC (este último carece de 18 genes delecionados selectivamente) que expresan antígenos del VIH, así como abrir nuevos campos de investigación en la generación y caracterización de nuevas vacunas contra hepatitis C y cáncer de próstata. Aunque se trata de distintas enfermedades, existe un común denominador entre los tres sistemas, y es que utilizan los mismos vectores pero con distintos antígenos. Así pues, en los próximos años generaremos nuevos vectores atenuados de MVA y NYVAC con deleciones e inserciones específicas y se estudiará la respuesta inmune y capacidad de inducir protección en modelos animales (ratón y monos). La finalidad es obtener en tres-cuatro años un vector modelo de MVA/NYVAC que reúna todas las condiciones óptimas de inducción de una respuesta celular específica frente a las proteínas del VIH para su ensayo clínico como vacunas de segunda/tercera generación frente al SIDA. Asimismo estos vectores optimizados de MVA/NYVAC

se utilizarán para expresar proteínas de hepatitis C y de tumores (melanoma y cáncer de próstata) como posibles vacunas contra estas enfermedades. Se establecerán parámetros inmunológicos que se correlacionen con protección y se seleccionarán los mejores vectores para ensayos clínicos como nuevas vacunas contra hepatitis C y cáncer de próstata.

### **E) Transferencia de la investigación básica a la clínica: promoción de ensayos clínicos en fase I/II**

Aunque está establecido que la investigación es fuente de progreso para la sociedad, una gran dificultad que encontramos los investigadores es la casi imposibilidad de trasladar la investigación básica a la clínica. Esta dificultad se basa fundamentalmente en la falta de financiación, ya que generalmente los proyectos básicos no contemplan ayudas para realizar ensayos clínicos en fase I (con un reducido número de voluntarios sanos, entre 12-20 por brazo). Además, la financiación que se consigue es por un período limitado, generalmente tres años, por lo que cuando se acaba el proyecto se paraliza la actividad investigadora. Otro factor es que los ensayos clínicos se tienen que realizar con material preparado en condiciones GMP (*good manufacture practice*), lo que redundará en un mayor coste económico. El argumento de que las empresas tienen que acarrear con los costes de los ensayos clínicos en fase I tiene la desventaja de que cada empresa mira por sus intereses e invierte sólo en aquellos ensayos que son beneficiosos para la empresa, por lo que sólo un número muy limitado de productos entran en fase clínica, como mencionamos al principio de este discurso. Así pues, la dificultad de obtener financiación en convocatorias nacionales o del Programa Marco de la UE para la realización de ensayos clínicos en fase I, condiciona la posibilidad de que investigadores de centros públicos en colaboración con hospitales puedan involucrarse en ensayos clínicos dirigidos a determinar la eficacia de nuevos productos biológicos con interés sanitario. Actualmente hay más de un millar de ensayos clínicos iniciados ([www.wiley.co.uk/genmed/clinical/](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/)), mayoritariamente dedicados al tratamiento de enfermedades oncológicas, seguido de enfermedades monogénicas, cardiovasculares e infecciosas, sobre todo en SIDA.

¿Cuáles son las opciones en España? Una posibilidad es conveniarse con una empresa para que lleve a cabo todos los ensayos clínicos, con

la dificultad que conlleva el que la empresa se interese por el producto. Otra posibilidad es la creación de empresas *start-up*, que tan buen resultado han dado en EE.UU., en Francia, Reino Unido y Alemania. En mis años de dirección en el CNB se crearon cuatro empresas en biotecnología, alguna de las cuales está iniciando ensayos clínicos en fase I. Es necesario estimular y fomentar desde los organismos públicos, Gobierno y CC.AA., la creación de estas empresas en España para incorporar el excelente potencial humano de investigadores jóvenes que trabajan dentro y fuera de nuestro país. Además, el sector privado debe involucrarse más activamente en la financiación de los ensayos clínicos en fase I, y ser la empresa la que tome el control en las fases II/III. Como ejemplo, tenemos el caso de la Fundación EuroVacc, de la que soy miembro fundador. Dicha fundación surge después de obtener financiación del V Programa Marco de la UE, y ante la imposibilidad de llevar a término los ensayos clínicos en fase I con los inmunógenos previamente generados contra el VIH/SIDA al finalizar los proyectos concedidos por la UE. Ante esta situación, EuroVacc ha establecido convenios con instituciones americanas, fundaciones y acuerdos con empresas del sector farmacéutico, para continuar con los ensayos clínicos y avanzar en el objetivo de desarrollo de una vacuna contra el SIDA. Así pues, debemos de establecer mecanismos ágiles que posibiliten la transferencia de tecnología desde la ciencia básica a la clínica.

## **F) Protección de la investigación: patentes**

Lógicamente para que un nuevo producto tenga interés industrial, debe de estar protegido a través de una patente y tener la precaución de patentar antes de publicar. España no ha tenido tradición en proteger la actividad investigadora, y aunque muchas patentes internacionales se basan en trabajos realizados por investigadores españoles, sin embargo las invenciones no fueron patentadas. El CSIC, que es el mayor organismo de investigación de España, con una plantilla de más de 3.000 investigadores, generó unos ingresos de alrededor de dos millones de euros por patentes en 2003, cantidad muy exigua si se compara con lo que generan algunas universidades americanas con mucho menor personal científico. Los costes derivados del mantenimiento de una patente limitan a que los centros públicos mantengan en vigor la patente por períodos largos. El objetivo fundamental de los centros públicos con

patentes es conceder una licencia a una empresa para su explotación y obtener beneficios en caso de explotación comercial. La patentabilidad de las invenciones es una asignatura pendiente en España. Es necesario dotar y fortalecer las unidades de transferencia de tecnología de los centros públicos de investigación en España.

## EPÍLOGO

Es indudable que el descubrimiento de los interferones y la aplicación de la vacunación constituyen grandes logros de la humanidad para combatir enfermedades. Los avances científicos en estos temas nos están abriendo las puertas para luchar contra aquellas otras enfermedades para las que aún no tenemos herramientas eficaces de control. Esto supone grandes retos y dificultades. Ya Pasteur, cien años después de que Jenner demostrara la vacunación contra la viruela, tuvo grandes dificultades para convencer a la sociedad de que la generación espontánea no existía y que son los microorganismos los que llevan a cabo los cambios químicos, los procesos de fermentación (vino, cerveza) y las enfermedades. Las experiencias del pasado nos han enseñado a entender que las repercusiones de la ciencia a la sociedad no son inmediatas en el tiempo. Hay que constatar que la mayor parte del trabajo científico no tiene aplicación directa aunque sí la tiene en el avance del conocimiento. Muy pocas moléculas alcanzan la fase clínica, pues como he comentado en el discurso, desde el descubrimiento a la aplicación terapéutica de un producto pueden transcurrir diez años con unos costes del orden de 600 millones de euros.

Es obvio que las aplicaciones que surgen de estos conocimientos y que inciden directamente sobre los seres humanos estén sujetas a normativas. La comunidad científica siempre ha sido la primera en alertar del impacto de la investigación a la sociedad. Sin embargo no conviene confundir entre avance del conocimiento, que es lo que la ciencia siempre produce, y malas aplicaciones de su uso. La realidad de la ciencia está reflejada en el fundamento del método de Rene Descartes (1596-1650) en «no admitir como verdadera cosa alguna que no se sepa con evidencia que lo es». La ciencia no puede estar sometida a restricciones legales de cómo hacer ciencia, pues ésta ha de ser siempre creativa. La ciencia no tiene fronteras y los países con más desarrollo económico e

industrial son aquellos que más invierten en ciencia. La ciencia da credibilidad al país donde se realiza y es una tarjeta de presentación para los Gobiernos que la apoyan. Como comentó en un discurso el que fue primer Presidente del Gobierno de la India, Jawaharlal Nehru (1889-1964): «el futuro pertenece a la ciencia y a los que se hacen amigos de la ciencia». Las contribuciones de la ciencia a la mejora de la calidad de vida de las personas son enormes y aún serán mayores en el futuro, a medida que vayamos entendiendo la función de cada uno de nuestros genes y lo que nos rodea. Aunque las enfermedades siempre estarán con nosotros, sin embargo su control será cada día mejor. Todos queremos vivir mejor, por eso la ciencia siempre acaba triunfando.

Podemos concluir con satisfacción que el trabajo llevado a cabo por Balmis en vacunación hace 200 años tiene su continuidad en nuestro país, con la aportación de otros grupos españoles, entre los que me incluyo, que mantenemos el mismo entusiasmo y abnegación en el estudio de enfermedades de gran impacto social. Indudablemente Balmis no hubiera conseguido sus objetivos sin la ayuda de la Corona. Tampoco nosotros podríamos alcanzar nuestros objetivos científicos sin las ayudas recibidas por distintas instituciones americanas, europeas y fundaciones. La lección de Balmis de ser generoso con los demás, contando con ayuda institucional, la podemos aplicar a nuestros días. España está produciendo científicos de excelencia, pero que necesitan del apoyo de nuestras instituciones para que podamos alcanzar el lugar que nos corresponde como país en las ciencias biomédicas y contribuir al desarrollo de nuevas vacunas contra enfermedades que nos afectan a todos y sobremanera a los países pobres. Ese es nuestro reto.

He dicho.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) EDUARDO RODRÍGUEZ ROVIRA, A. D.-G. H., ANTONIO PORTOLÉS ALONSO (2000): «Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Rafael Cadórniga Carro». *Anal. Real Acad. Farm.* 66: 449-469.
- (2) VENTER, J. C., M. D. ADAMS, E. W. MYERS, P. W. LI, R. J. MURAL, G. G. SUTTON, H. O. SMITH, M. YANDELL, C. A. EVANS, R. A. HOLT, J. D. GOCAYNE, P. AMANATIDES, R. M. BALLEW, D. H. HUSON, J. R. WORTMAN, Q. ZHANG, C.

D. KODIRA, X. H. ZHENG, L. CHEN, M. SKUPSKI, G. SUBRAMANIAN, P. D. THOMAS, J. ZHANG, G. L. GABOR MIKLOS, C. NELSON, S. BRODER, A. G. CLARK, J. NADEAU, V. A. MCKUSICK, N. ZINDER, A. J. LEVINE, R. J. ROBERTS, M. SIMON, C. SLAYMAN, M. HUNKAPILLER, R. BOLANOS, A. DELCHER, I. DEW, D. FASULO, M. FLANIGAN, L. FLOREA, A. HALPERN, S. HANNENHALLI, S. KRAVITZ, S. LEVY, C. MOBARRY, K. REINERT, K. REMINGTON, J. ABU-THREIDEH, E. BEASLEY, K. BIDDICK, V. BONAZZI, R. BRANDON, M. CARGILL, I. CHANDRAMOULISWARAN, R. CHARLAB, K. CHATURVEDI, Z. DENG, V. DI FRANCESCO, P. DUNN, K. EILBECK, C. EVANGELISTA, A. E. GABRIELIAN, W. GAN, W. GE, F. GONG, Z. GU, P. GUAN, T. J. HEIMAN, M. E. HIGGINS, R. R. JI, Z. KE, K. A. KETCHUM, Z. LAI, Y. LEI, Z. LI, J. LI, Y. LIANG, X. LIN, F. LU, G. V. MERKULOV, N. MILSHINA, H. M. MOORE, A. K. NAIK, V. A. NARAYAN, B. NEELAM, D. NUSSKERN, D. B. RUSCH, S. SALZBERG, W. SHAO, B. SHUE, J. SUN, Z. WANG, A. WANG, X. WANG, J. WANG, M. WEI, R. WIDES, C. XIAO, C. YAN, A. YAO, J. YE, M. ZHAN, W. ZHANG, H. ZHANG, Q. ZHAO, L. ZHENG, F. ZHONG, W. ZHONG, S. ZHU, S. ZHAO, D. GILBERT, S. BAUMHUETER, G. SPIER, C. CARTER, A. CRAVCHIK, T. WOODAGE, F. ALI, H. AN, A. AWE, D. BALDWIN, H. BADEN, M. BARNSTEAD, I. BARROW, K. BEESON, D. BUSAM, A. CARVER, A. CENTER, M. L. CHENG, L. CURRY, S. DANAHER, L. DAVENPORT, R. DESILETS, S. DIETZ, K. DODSON, L. DOUP, S. FERRIERA, N. GARG, A. GLUECKSMANN, B. HART, J. HAYNES, C. HAYNES, C. HEINER, S. HLAUN, D. HOSTIN, J. HOUCK, T. HOWLAND, C. IBEGWAM, J. JOHNSON, F. KALUSH, L. KLINE, S. KODURU, A. LOVE, F. MANN, D. MAY, S. MCCAWLEY, T. MCINTOSH, I. McMULLEN, M. MOY, L. MOY, B. MURPHY, K. NELSON, C. PFANNKOCH, E. PRATTS, V. PURI, H. QURESHI, M. REARDON, R. RODRIGUEZ, Y. H. ROGERS, D. ROMBLAD, B. RUHFEL, R. SCOTT, C. SITTER, M. SMALLWOOD, E. STEWART, R. STRONG, E. SUH, R. THOMAS, N. N. TINT, S. TSE, C. VECH, G. WANG, J. WETTER, S. WILLIAMS, M. WILLIAMS, S. WINDSOR, E. WINN-DEEN, K. WOLFE, J. ZAVERI, K. ZAVERI, J. F. ABRIL, R. GUIGO, M. J. CAMPBELL, K. V. SJOLANDER, B. KARLAK, A. KEJARIWAL, H. MI, B. LAZAREVA, T. HATTON, A. NARECHANIA, K. DIEMER, A. MURUGANUJAN, N. GUO, S. SATO, V. BAFNA, S. ISTRAIL, R. LIPPERT, R. SCHWARTZ, B. WALENZ, S. YOOSEPH, D. ALLEN, A. BASU, J. BAXENDALE, L. BLICK, M. CAMINHA, J. CARNES-STINE, P. CAULK, Y. H. CHIANG, M. COYNE, C. DAHLKE, A. MAYS, M. DOMBROSKI, M. DONNELLY, D. ELY, S. ESPARHAM, C. FOSLER, H. GIRE, S. GLANOWSKI, K. GLASSER, A. GLODEK, M. GOROKHOV, K. GRAHAM, B. GROPMAN, M. HARRIS, J. HEIL, S. HENDERSON, J. HOOVER, D. JENNINGS, C. JORDAN, J. JORDAN, J. KASHA, L. KAGAN, C. KRAFT, A. LEVITSKY, M. LEWIS, X. LIU, J. LOPEZ, D. MA, W. MAJOROS, J. MCDANIEL, S. MURPHY, M. NEWMAN, T. NGUYEN, N. NGUYEN, M. NODELL, S. PAN, J. PECK, M. PETERSON, W. ROWE, R. SANDERS, J. SCOTT, M. SIMPSON, T. SMITH, A. SPRAGUE, T. STOCKWELL, R. TURNER, E. VENTER, M. WANG, M. WEN, D. WU, M. WU, A. XIA, A. ZANDIEH and X. ZHU (2001): The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.

- (3) COLLINS, F. S., M. MORGAN and A. PATRINOS (2003): The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science* 300: 286-290.

- (4) SNOW, R. W., M. CRAIG, U. DEICHMANN and K. MARSH (1999): Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population. *Bull World Health Organ* 77: 624-640.
- (5) ASHFORD, R. W., P. DESJEUX and P. DERAADT (1992): Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. *Parasitol Today* 8: 104-105.
- (6) (2000): WHO/LEISH. *World Health Organization* 42: 1-12.
- (7) GONZALO, R. M., D. RODRÍGUEZ, A. GARCÍA-SASTRE, J. R. RODRÍGUEZ, P. PALESE and M. ESTEBAN (1999): Enhanced CD8+ T cell response to HIV-1 env by combined immunization with influenza and vaccinia virus recombinants. *Vaccine* 17: 887-892.
- (8) GONZALO, R. M., J. R. RODRÍGUEZ, D. RODRÍGUEZ, G. GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, V. LARRAGA and M. ESTEBAN (2001): Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes Infect* 3: 701-711.
- (9) GRADONI, L. (2001): An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100: 87-103.
- (10) BERRAHAL, F., C. MARY, M. ROZE, A. BERENGER, K. ESCOFFIER, D. LAMOUROUX and S. DUNAN (1996): Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 55: 273-277.
- (11) LANOTTE, G., J. A. RIOUX, J. PERIERES and Y. VOLLHARDT (1979): [Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology (author's transl)]. *Ann Parasitol Hum Comp* 54: 277-295.
- (12) (1995): WHO/LEISH. *World Health Organization* 95: 1-14.
- (13) (2005): UNIAIDS, WHO. *World Health Organization*.
- (14) KAUFMANN, S. H. and A. J. McMICHAEL (2005): Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med* 11: S33-44.
- (15) SHEPARD, C. W., L. FINELLI and M. J. ALTER (2005): Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558-567.
- (16) SHIMOTOHNO, K. (2000): Hepatitis C virus and its pathogenesis. *Semin Cancer Biol* 10: 233-240.
- (17) KOCHANNEK, K. D., S. L. MURPHY, R. N. ANDERSON and C. SCOTT (2004): Deaths: final data for 2002. *Natl Vital Stat Rep* 53: 1-115.
- (18) MOYNAGH, P. N. (2005): TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol* 26: 469-476.

- (19) BOWIE, A. G. and I. R. HAGA (2005): The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* 42: 859-867.
- (20) ISAACS, A. and J. LINDENMANN (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147: 258-267.
- (21) ISAACS, A., J. LINDENMANN and R. C. VALENTINE (1957): Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147: 268-273.
- (22) PLATANIAS, L. C. (2005): Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5: 375-386.
- (23) STARK, G. R., I. M. KERR, B. R. WILLIAMS, R. H. SILVERMAN and R. D. SCHREIBER (1998): How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.
- (24) PESTKA, S., C. D. KRAUSE and M. R. WALTER (2004): Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202: 8-32.
- (25) PESTKA, S., J. A. LANGER, K. C. ZOON and C. E. SAMUEL (1987): Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56: 727-777.
- (26) KATZE, M. G., Y. HE and M. GALE, JR. (2002): Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2: 675-687.
- (27) TANIGUCHI, T., Y. FUJII-KURIYAMA and M. MURAMATSU (1980): Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4003-4006.
- (28) TANIGUCHI, T., L. GUARENTE, T. M. ROBERTS, D. KIMELMAN, J. DOUHAN, 3rd and M. PTASHNE (1980): Expression of the human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5230-5233.
- (29) DARNELL, J. E., JR., I. M. KERR and G. R. STARK (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415-1421.
- (30) BACH, E. A., M. AGUET and R. D. SCHREIBER (1997): The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15: 563-591.
- (31) DARNELL, J. E., JR. (1997): STATs and gene regulation. *Science* 277: 1630-1635.
- (32) DER, S. D., A. ZHOU, B. R. WILLIAMS and R. H. SILVERMAN (1998): Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15623-15628.
- (33) SAMUEL, C. E. (2001): Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14: 778-809, table of contents.
- (34) METZ, D. H. and M. ESTEBAN (1972): Interferon inhibits viral protein synthesis in L cells infected with vaccinia virus. *Nature* 238: 385-388.

- (35) ESTEBAN, M. and D. H. METZ (1973): Inhibition of early vaccinia virus protein synthesis in interferon-treated chicken embryo fibroblasts. *J Gen Virol* 20: 111-115.
- (36) FRIEDMAN, R. M., R. M. ESTEBAN, D. H. METZ, D. R. TOVELL, I. M. KERR and R. WILLIAMSON (1972): Translation of RNA by L cell extracts: Effect of interferon. *FEBS Lett* 24: 273-277.
- (37) FRIEDMAN, R. M., D. H. METZ, R. M. ESTEBAN, D. R. TOVELL, L. A. BALL and I. M. KERR (1972): Mechanism of interferon action: inhibition of viral messenger ribonucleic acid translation in L-cell extracts. *J Virol* 10: 1184-1198.
- (38) METZ, D. H., M. ESTEBAN and G. DANIELESCU (1975): The effect of interferon on the formation of virus polyribosomes in L cells infected with vaccinia virus. *J Gen Virol* 27: 197-209.
- (39) BARBER, G. N. (2005): The dsRNA-dependent protein kinase, PKR and cell death. *Cell Death Differ* 12: 563-570.
- (40) GIL, J., J. ALCAMI and M. ESTEBAN (1999): Induction of apoptosis by double-stranded-RNA-dependent protein kinase (PKR) involves the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 19: 4653-4663.
- (41) GIL, J., J. ALCAMI and M. ESTEBAN (2000): Activation of NF-kappa B by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR involves the I kappa B kinase complex. *Oncogene* 19: 1369-1378.
- (42) GIL, J., M. ESTEBAN and D. ROTH (2000): *In vivo* regulation of the dsRNA-dependent protein kinase PKR by the cellular glycoprotein p67. *Biochemistry* 39: 16016-16025.
- (43) GIL, J., M. A. GARCÍA and M. ESTEBAN (2002): Caspase 9 activation by the dsRNA-dependent protein kinase, PKR: molecular mechanism and relevance. *FEBS Lett* 529: 249-255.
- (44) GIL, J., J. RULLAS, M. A. GARCÍA, J. ALCAMI and M. ESTEBAN (2001): The catalytic activity of dsRNA-dependent protein kinase, PKR, is required for NF-kappaB activation. *Oncogene* 20: 385-394.
- (45) Gil, J. A. E. M. (2004): Vaccinia virus recombinants as a model system to analyze IFN-induced pathways. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 24: 637-646.
- (46) LEE, S. B., R. BABLANIAN and M. ESTEBAN (1996): Regulated expression of the interferon-induced protein kinase p68 (PKR) by vaccinia virus recombinants inhibits the replication of vesicular stomatitis virus but not that of poliovirus. *J Interferon Cytokine Res* 16: 1073-1078.
- (47) LEE, S. B. and M. ESTEBAN (1994): The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase induces apoptosis. *Virology* 199: 491-496.
- (48) LEE, S. B., Z. MELKOVA, W. YAN, B. R. WILLIAMS, A. G. HOVANESSIAN and M. ESTEBAN (1993): The interferon-induced double-stranded RNA-activated

- human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells. *Virology* 192: 380-385.
- (49) LEE, S. B., D. RODRÍGUEZ, J. R. RODRÍGUEZ and M. ESTEBAN (1997): The apoptosis pathway triggered by the interferon-induced protein kinase PKR requires the third basic domain, initiates upstream of Bcl-2 and involves ICE-like proteases. *Virology* 231: 81-88.
- (50) WILLIAMS, B. R. (1999): PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18: 6112-6120.
- (51) FIERRO-MONTI, I. and M. B. MATHEWS (2000): Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem Sci* 25: 241-246.
- (52) SCHNEIDER, R. J. and I. MOHR (2003): Translation initiation and viral tricks. *Trends Biochem Sci* 28: 130-136.
- (53) DROIN, N. M. and D. R. GREEN (2004): Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta* 1644: 179-188.
- (54) GIL, J. and M. ESTEBAN (2000): The interferon-induced protein kinase (PKR), triggers apoptosis through FADD-mediated activation of caspase 8 in a manner independent of Fas and TNF-alpha receptors. *Oncogene* 19: 3665-3674.
- (55) BALDWIN, A. S., JR. (1996): The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14: 649-683.
- (56) BEG, A. A. and D. BALTIMORE (1996): An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274: 782-784.
- (57) GIL, J., M. A. GARCÍA, P. GÓMEZ-PUERTAS, S. GUERRA, J. RULLAS, H. NAKANO, J. ALCAMI and M. ESTEBAN (2004): TRAF family proteins link PKR with NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 24: 4502-4512.
- (58) LEE, S. B., S. R. GREEN, M. B. MATHEWS and M. ESTEBAN (1994): Activation of the double-stranded RNA (dsRNA)-activated human protein kinase in vivo in the absence of its dsRNA binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10551-10555.
- (59) TAYLOR, D. R., S. B. LEE, P. R. ROMANO, D. R. MARSHAK, A. G. HINNEBUSCH, M. ESTEBAN and M. B. MATHEWS (1996): Autophosphorylation sites participate in the activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR. *Mol Cell Biol* 16: 6295-6302.
- (60) RIEDL, S. J. and Y. SHI (2004): Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 897-907.
- (61) BOSSY-WETZEL, E., D. D. NEWMAYER and D. R. GREEN (1998): Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17: 37-49.

- (62) CHAWLA-SARKAR, M., D. J. LINDNER, Y. F. LIU, B. R. WILLIAMS, G. C. SEN, R. H. SILVERMAN and E. C. BORDEN (2003): Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* 8: 237-249.
- (63) KORSMEYER, S. J., M. C. WEI, M. SAITO, S. WEILER, K. J. OH and P. H. SCHLESINGER (2000): Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7: 1166-1173.
- (64) LI, G., Y. XIANG, K. SABAPATHY and R. H. SILVERMAN (2004): An apoptotic signaling pathway in the interferon antiviral response mediated by RNase L and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 279: 1123-1131.
- (65) MARTIN, A. G. and H. O. FEARNHEAD (2002): Apocytochrome c blocks caspase-9 activation and Bax-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 50834-50841.
- (66) MARTINOU, J. C., S. DESAGHER and B. ANTONSSON (2000): Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2: E41-43.
- (67) RICCI, J. E., R. A. GOTTLIEB and D. R. GREEN (2003): Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 160: 65-75.
- (68) WANG, X. (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-2933.
- (69) JAGUS, R., B. JOSHI and G. N. BARBER (1999): PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 123-138.
- (70) VORBURGER, S. A., A. PATAER, S. G. SWISHER and K. K. HUNT (2004): Genetically targeted cancer therapy: tumor destruction by PKR activation. *Am J Pharmacogenomics* 4: 189-198.
- (71) KERR, I. M. and R. E. BROWN (1978): pppA<sub>2</sub>'p5'A<sub>2</sub>'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 256-260.
- (72) MASHIMO, T., P. GLASER, M. LUCAS, D. SIMON-CHAZOTTES, P. E. CECCALDI, X. MONTAGUTELLI, P. DESPRES and J. L. GUENET (2003): Structural and functional genomics and evolutionary relationships in the cluster of genes encoding murine 2',5'-oligoadenylate synthetases. *Genomics* 82: 537-552.
- (73) ZHOU, A., B. A. HASSEL and R. H. SILVERMAN (1993): Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell* 72: 753-765.
- (74) REBOUILLAT, D. and A. G. HOVANESSIAN (1999): The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties. *J Interferon Cytokine Res* 19: 295-308.
- (75) CARPTEN, J., N. NUPPONEN, S. ISAACS, R. SOOD, C. ROBBINS, J. XU, M. FARUQUE, T. MOSES, C. EWING, E. GILLANDERS, P. HU, P. BUJNOVSZKY, I. MAKALOWSKA,

- A. BAFFOE-BONNIE, D. FAITH, J. SMITH, D. STEPHAN, K. WILEY, M. BROWNSTEIN, D. GILDEA, B. KELLY, R. JENKINS, G. HOSTETTER, M. MATIKAINEN, J. SCHLEUTKER, K. KLINGER, T. CONNORS, Y. XIANG, Z. WANG, A. DE MARZO, N. PAPA-DOPOULOS, O. P. KALLIONIEMI, R. BURK, D. MEYERS, H. GRONBERG, P. MELTZER, R. SILVERMAN, J. BAILEY-WILSON, P. WALSH, W. ISAACS and J. TRENT (2002): Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet* 30: 181-184.
- (76) SILVERMAN, R. H. (2003): Implications for RNase L in prostate cancer biology. *Biochemistry* 42: 1805-1812.
- (77) DÍAZ-GUERRA, M., C. RIVAS and M. ESTEBAN (1997): Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology* 227: 220-228.
- (78) DÍAZ-GUERRA, M., C. RIVAS and M. ESTEBAN (1997): Activation of the IFN-inducible enzyme RNase L causes apoptosis of animal cells. *Virology* 236: 354-363.
- (79) CASTELLI, J. C., B. A. HASSEL, A. MARAN, J. PARANJAPPE, J. A. HEWITT, X. L. LI, Y. T. HSU, R. H. SILVERMAN and R. J. YOULE (1998): The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ* 5: 313-320.
- (80) HENGEL, H., U. H. KOSZINOWSKI and K. K. CONZELMANN (2005): Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol* 26: 396-401.
- (81) PÁEZ, E. and M. ESTEBAN (1984): Resistance of vaccinia virus to interferon is related to an interference phenomenon between the virus and the interferon system. *Virology* 134: 12-28.
- (82) MCFADDEN, G. (2005): Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* 3: 201-213.
- (83) MOSS, B. and J. L. SHISLER (2001): Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin Immunol* 13: 59-66.
- (84) BEATTIE, E., K. L. DENZLER, J. TARTAGLIA, M. E. PERKUS, E. PAOLETTI and B. L. JACOBS (1995): Reversal of the interferon-sensitive phenotype of a vaccinia virus lacking E3L by expression of the reovirus S4 gene. *J Virol* 69: 499-505.
- (85) CHANG, H. W., J. C. WATSON and B. L. JACOBS (1992): The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4825-4829.
- (86) RIVAS, C., J. GIL, Z. MELKOVA, M. ESTEBAN and M. DÍAZ-GUERRA (1998): Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243: 406-414.
- (87) SHARP, T. V., F. MOONAN, A. ROMASHKO, B. JOSHI, G. N. BARBER and R. JAGUS (1998): The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regula-

- tory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250: 302-315.
- (88) BEATTIE, E., E. PAOLETTI and J. TARTAGLIA (1995): Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. *Virology* 210: 254-263.
- (89) GIL, J., J. RULLAS, J. ALCAMI and M. ESTEBAN (2001): MC159L protein from the poxvirus molluscum contagiosum virus inhibits NF-kappaB activation and apoptosis induced by PKR. *J Gen Virol* 82: 3027-3034.
- (90) BRUN, A., C. RIVAS, M. ESTEBAN, J. M. ESCRIBANO and C. ALONSO (1996): African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology* 225: 227-230.
- (91) SUÁREZ, P., M. DÍAZ-GUERRA, C. PRIETO, M. ESTEBAN, J. M. CASTRO, A. NIETO and J. ORTIN (1996): Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J Virol* 70: 2876-2882.
- (92) ESTEBAN, M., M. A. GARCÍA, E. DOMINGO-GIL, J. ARROYO, C. NOMBELA and C. RIVAS (2003): The latency protein LANA2 from Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits apoptosis induced by dsRNA-activated protein kinase but not RNase L activation. *J Gen Virol* 84: 1463-1470.
- (93) PATEL, R. C. and G. C. SEN (1998): PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *Embo J* 17: 4379-4390.
- (94) BARBER, G. N., S. THOMPSON, T. G. LEE, T. STROM, R. JAGUS, A. DARVEAU and M. G. KATZE (1994): The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4278-4282.
- (95) BORDEN, E. C. (2005): Review: Milstein Award lecture: interferons and cancer: where from here? *J Interferon Cytokine Res* 25: 511-527.
- (96) ARNASON, B. G. (2005): Long-term experience with interferon beta-1b (Betaferon) in multiple sclerosis. *J Neurol* 252 Suppl 3: iii28-iii33.
- (97) JACOBSON, I. M., S. A. GONZÁLEZ, F. AHMED, E. LEBOVICS, A. D. MIN, H. C. BODENHEIMER, JR., S. P. ESPÓSITO, R. S. BROWN, JR., N. BRAU, F. M. KLION, H. TOBIAS, E. J. BINI, N. BRODSKY, M. A. CERULLI, A. AYTAMAN, P. W. GARDNER, J. M. GEDERS, J. E. SPIVACK, M. G. RAHMIN, D. H. BERMAN, J. EHRLICH, M. W. RUSSO, M. CHAIT, D. ROVNER and B. R. EDLIN (2005): A randomized trial of pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin in the retreatment of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 100: 2453-2462.
- (98) SMITH, G. L. and G. MCFADDEN (2002): Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol* 2: 521-527.
- (99) SUTTER, G., L. S. WYATT, P. L. FOLEY, J. R. BENNINK and B. MOSS (1994): A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenua-

- ted MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12: 1032-1040.
- (100) SYED, V., K. MUKHERJEE, J. LYONS-WEILER, K. M. LAU, T. MASHIMA, T. TSURUO and S. M. Ho (2005): Identification of ATF-3, caveolin-1, DLC-1 and NM23-H2 as putative antitumorigenic, progesterone-regulated genes for ovarian cancer cells by gene profiling. *Oncogene* 24: 1774-1787.
- (101) FENNER, F. ANDERSON, D. A., ARITA, I., JEZEK, Z. and Ladnyi, I. D. (1988): *Smallpox and its eradication*. World Health Organization, Geneva.
- (102) JENNER, E. (1799): *Further observations on the variola vaccine*. Sampson Low, London.
- (103) JENNER, E. (1798): *An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccine, a disease discovered in some of the Western Countries of England, particularly Gloucestershire and known by the name of Cow-pox*. Sampson Low.
- (104) BAXBY, D. (1999): Edward Jenner's Inquiry; a bicentenary analysis. *Vaccine* 17: 301-307.
- (105) RAMÍREZ, S., VALENCIANO, L., NÁJERA, R. and ENJUANES, L. (2004): *La Real Expedición Filantrópica de la Vacuna: doscientos años de lucha contra la viruela*, Madrid.
- (106) BERCHE, P. (2001): The threat of smallpox and bioterrorism. *Trends Microbiol* 9: 15-18.
- (107) MOSS, B. (2001): *Poxviruses and their replication*. Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia.
- (108) LEWIS-JONES, S. (2004): Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr Opin Infect Dis* 17: 81-89.
- (109) BRAY, M. and C. J. ROY (2004): Antiviral prophylaxis of smallpox. *J Antimicrob Chemother* 54: 1-5.
- (110) SEET, B. T., J. B. JOHNSTON, C. R. BRUNETTI, J. W. BARRETT, H. EVERETT, C. CAMERON, J. SYPULA, S. H. NAZARIAN, A. LUCAS and G. MCFADDEN (2003): Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 21: 377-423.
- (111) MOSS, B. (1996): Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination and safety. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11341-11348.
- (112) PAOLETTI, E. (1996): Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11349-11353.
- (113) SMITH, G. L., A. VANDERPLASSCHEN and M. LAW (2002): The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* 83: 2915-2931.
- (114) CUDMORE, S., P. COSSART, G. GRIFFITHS and M. WAY (1995): Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378: 636-638.

- (115) DE MAGALHAES, J. C., A. A. ANDRADE, P. N. SILVA, L. P. SOUSA, C. ROPERT, P. C. FERREIRA, E. G. KROON, R. T. GAZZINELLI and C. A. BONJARDIM (2001): A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem* 276: 38353-38360.
- (116) CYRKLAFF, M., C. RISCO, J. J. FERNÁNDEZ, M. V. JIMÉNEZ, M. ESTEBAN, W. BAUMEISTER and J. L. CARRASCOA (2005): Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 2772-2777.
- (117) GUBSER, C., S. HUE, P. KELLAM and G. L. SMITH (2004): Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85: 105-117.
- (118) MASSUNG, R. F., L. I. LIU, J. QI, J. C. KNIGHT, T. E. YURAN, A. R. KERLAVAGE, J. M. PARSONS, J. C. VENTER and J. J. ESPÓSITO (1994): Analysis of the complete genome of smallpox variola major virus strain Bangladesh-1975. *Virology* 201: 215-240.
- (119) LAI, C. F., S. C. GONG and M. ESTEBAN (1991): The purified 14-kilodalton envelope protein of vaccinia virus produced in *Escherichia coli* induces virus immunity in animals. *J Virol* 65: 5631-5635.
- (120) BIENIASZ, P. D. (2004): Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 5: 1109-1115.
- (121) CHAUDHRI, G., V. PANCHANATHAN, R. M. BULLER, A. J. VAN DEN EERTWEGH, E. CLAASSEN, J. ZHOU, R. DE CHAZAL, J. D. LAMAN and G. KARUPIAH (2004): Polarized type 1 cytokine response and cell-mediated immunity determine genetic resistance to mousepox. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9057-9062.
- (122) GUERRA, S., L. A. LÓPEZ-FERNÁNDEZ, R. CONDE, A. PASCUAL-MONTANO, K. HARSHMAN and M. ESTEBAN (2004): Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J Virol* 78: 5820-5834.
- (123) GUERRA, S., L. A. LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A. PASCUAL-MONTANO, M. MUNOZ, K. HARSHMAN and M. ESTEBAN (2003): Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J Virol* 77: 6493-6506.
- (124) GUERRA, S., M. ARACIL, R. CONDE, A. BERNAD and M. ESTEBAN (2005): Wiskott-Aldrich syndrome protein is needed for vaccinia virus pathogenesis. *J Virol* 79: 2133-2140.
- (125) STAIB, C., I. DREXLER and G. SUTTER (2004): Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods Mol Biol* 269: 77-100.
- (126) PASTORET, P. P. and A. VANDERPLASSCHEN (2003): Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26: 343-355.
- (127) MAYR, A., H. STICKL, H. K. MULLER, K. DANNER and H. SINGER (1978): [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience

gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [B]* 167: 375-390.

- (128) MOSS, B., M. W. CARROLL, L. S. WYATT, J. R. BENNINK, V. M. HIRSCH, S. GOLDSTEIN, W. R. ELKINS, T. R. FUERST, J. D. LIFSON, M. PIATAK, N. P. RES- TIFO, W. OVERWIJK, R. CHAMBERLAIN, S. A. ROSENBERG and G. SUTTER (1996): Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* 397: 7-13.
- (129) SUTTER, G. and C. STAIB (2003): Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3: 263-271.
- (130) LI, S., M. RODRIGUES, D. RODRÍGUEZ, J. R. RODRÍGUEZ, M. ESTEBAN, P. PALESE, R. S. NUSSENZWEIG and F. ZAVALA (1993): Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5214-5218.
- (131) RODRIGUES, M., S. LI, K. MURATA, D. RODRÍGUEZ, J. R. RODRÍGUEZ, I. BACIK, J. R. BENNINK, J. W. YEWDELL, A. GARCÍA-SASTRE, R. S. NUSSENZWEIG and et al. (1994): Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J Immunol* 153: 4636-4648.
- (132) MIYAHIRA, Y., A. GARCÍA-SASTRE, D. RODRÍGUEZ, J. R. RODRÍGUEZ, K. MURATA, M. TSUJI, P. PALESE, M. ESTEBAN, F. ZAVALA and R. S. NUSSENZWEIG (1998): Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8+ responses in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3954-3959.
- (133) GHERARDI, M. M., E. PÉREZ-JIMÉNEZ, J. L. NAJERA and M. ESTEBAN (2004): Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J Immunol* 172: 6209-6220.
- (134) ALCAMI, A. (2003): Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol* 3: 36-50.
- (135) GHERARDI, M. M. and M. ESTEBAN (2005): Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol* 86: 2925-2936.
- (136) GHERARDI, M. M., J. C. RAMÍREZ, D. RODRÍGUEZ, J. R. RODRÍGUEZ, G. SANO, F. ZAVALA and M. ESTEBAN (1999): IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J Immunol* 162: 6724-6733.
- (137) GHERARDI, M. M., J. C. RAMÍREZ and M. ESTEBAN (2003): IL-12 and IL-18 act in synergy to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *J Gen Virol* 84: 1961-1972.



**CONTESTACIÓN DE LA EXCMA. SRA.  
D.<sup>a</sup> MARÍA CASCALES ANGOSTO  
Académico de Número**



*Excelentísimo Señor Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia,*

*Excelentísimas Académicas,*

*Excelentísimos Académicos,*

*Señoras y Señores:*

La Real Academia Nacional de Farmacia se engalana hoy para recibir a un nuevo académico. Con alegría y satisfacción acepto hoy la comisión recibida por nuestro Presidente y la Junta de Gobierno, de adelantarme en nombre de la Real Academia Nacional de Farmacia para contestar al discurso y dar la primera bienvenida al Profesor Doctor Don MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ en este momento solemne de su ingreso en nuestra Real Academia. Pocos encargos podrían serme más gratos, ya que quien hoy se integra en nuestra comunidad científica e investigadora es un querido y admirado amigo y un hombre extraordinario que va a poner a servicio de esta prestigiosa Corporación sus cualidades de optimismo, vitalidad, iniciativa, talento y vocación por la Ciencia. Este acto protocolario va unido al hecho de poner de manifiesto ante ustedes los méritos profesionales y la trayectoria científica del Doctor Esteban Rodríguez, que le hacen acreedor a acceder al rango de Académico de Número.

## **COMENTARIO A SU *CURRICULUM VITAE***

El Profesor Esteban Rodríguez nació en Villalón de Campos, provincia de Valladolid. Estudia el bachillerato como alumno interno en el Colegio Castilla de los Hermanos Maristas en Palencia, donde culmina con brillantez todos los cursos. Su vocación por la investigación se debe a la influencia familiar de sus padres. Su padre, farmacéutico vocacio-

nal, y su madre maestra, saben inculcar en su hijo la curiosidad y el estudio por las ciencias de la vida y de la salud. Cursa la Licenciatura en la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela en el antiguo Palacio de Fonseca, donde tiene como profesores a los Académicos Pablo Sanz Pedrero, Manuel Gómez Serranillos, Rafael Cadórniga Carro (cuya vacante va a ocupar), José Miñones y José Antonio Cabezas. Finaliza sus estudios de Licenciatura en 1967 y realiza el Doctorado en Microbiología en la misma Universidad, con la tesis titulada «Actividades biológicas y bioquímicas del *Streptococcus faecalis* (Enterococo)» en el laboratorio de Microbiología, siendo la tesis dirigida por el Profesor Benito Regueiro Varela, obteniendo en 1970 la máxima calificación de sobresaliente *cum laude* y siendo miembro del tribunal el Académico Gregorio Valera Mosquera. También obtiene la licenciatura en la primera promoción de Ciencias Biológicas por la Universidad de Santiago de Compostela.

La vida profesional del Doctor Esteban Rodríguez ha estado encaminada hacia la ciencia y la investigación e inmersa en el laboratorio, sin escatimar esfuerzos, con apasionamiento y total dedicación. Cuando se examina la trayectoria seguida a lo largo de los años de intenso y profundo trabajo, uno se queda impresionado por el dinamismo y el entusiasmo que Mariano ha derrochado en todo lo que ha emprendido.

Durante su fase de doctorando, nuestro nuevo Académico entra en contacto con David Vázquez del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, cuyo grupo lideraba a nivel internacional los mecanismos moleculares de acción de los antibióticos, y a quien agradece la introducción a la biología molecular. Más tarde se relacionaría también con los grupos de Margarita Salas y Eladio Viñuela, con los que siempre mantuvo una relación científica y de amistad, especialmente con Eladio, por la afinidad y complementariedad en las investigaciones que ambos realizaban sobre la biología de virus con DNA de gran tamaño. Fueron estos sus inicios de relación con excelentes investigadores del CSIC los que le sirvieron para conocer mejor dicha institución, a la que posteriormente se integraría.

Aunque había sido aceptado como becario postdoctoral en los laboratorios de David Schlessinger en Saint Louis, Missouri, y de Mark Richmond en Bristol, en 1970 se traslada a Londres atraído por las

investigaciones sobre los interferones que se realizaban en el laboratorio de Virología dirigido por David Metz en el National Institute for Medical Research. Los interferones habían sido descubiertos en este mismo laboratorio unos años antes por Isaacs y Lindenman, y él tuvo la suerte de ocupar la misma mesa de Isaacs. En esta época, primero como becario del British Council y luego como becario de EMBO, consiguió demostrar el mecanismo de acción de los interferones, moléculas con gran actividad biológica, pioneras en el campo de las citoquinas, como agentes con amplio espectro biológico, con actividad antiviral, antitumoral e inmunomoduladora. Las contribuciones del grupo quedaron recogidas en una publicación que Metz y Esteban enviaron a la revista *Nature*. En ellas se definía el lugar primario de acción de los interferones a nivel de la traducción de los RNA mensajeros y la consiguiente inhibición en la síntesis de proteínas víricas. En este momento conoce a Walter Schlesinger, quien le convence para ir con un contrato a los Estados Unidos a su Departamento de Microbiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Rutgers en New Jersey. Así en el verano de 1974 se traslada a New Jersey e inicia una nueva etapa, estudiando con John Holowzack los mecanismos de replicación del DNA (197.000 nucleótidos) en el virus *vaccinia*. En estos años el Doctor Esteban Rodríguez estableció las bases moleculares de los mecanismos de replicación del DNA del virus *vaccinia* (iniciación, elongación y terminación), así como la definición de las secuencias de transcripción vírica en modelos *in vitro* e *in vivo*. Consiguió purificar moléculas completas del DNA, y aplicar la microscopía electrónica para definir su tamaño, visualizar complejos transcripcionales y caracterizar el modo de replicación del DNA.

Como anécdota quiero mostrarles que, no sólo nuestro Académico destacaba por su producción científica, sino que la popularidad entre sus colegas alcanzó las mayores cotas cuando hizo gala de su faceta culinaria y fue invitado por el Departamento a presentar el seminario titulado «How to make a Spanish omelette» que tuvo lleno completo y en el que le hicieron multitud de preguntas y cómo no, se degustaron al final de la conferencia las tortillas de la casa.

La inquietud científica de Mariano le hace estar siempre al tanto de cualquier avance de la Ciencia en su campo y ante la nueva tecnología de Maxam y Gilbert para secuenciar DNA, busca la forma de trasladarse en 1978 con una beca EMBO al Departamento de Biología Molecu-

lar de la Universidad de Gante con Walter Fiers, quien acababa de publicar en la revista *Nature* la primera secuenciación completa de un virus animal, el SV40 con un genoma de 5.000 nucleótidos. En dicho laboratorio, el Doctor Esteban Rodríguez lleva a cabo la secuenciación de genomas virales. Aquí permanecerá menos de un año, porque recibe una oferta como Assistant Professor en la Facultad de Medicina de la Universidad del Estado de Nueva York (SUNY) en Brooklyn. El nuevo traslado en enero de 1979 le hace emprender una carrera fulgurante que en pocos años le permite ascender en un entorno difícil y competitivo como «Associate Profesor» con categoría de funcionario y a «Full Professor», primero del Departamento de Bioquímica y luego del Departamento de Microbiología e Inmunología, contribuyendo a la actividad científica y académica de los dos departamentos. En estos años establece un grupo de investigación propia muy dinámica que investiga sobre la acción de los interferones y en la biología del virus *vaccinia* y su relación con el hospedador. A este grupo se incorporan su mujer M.<sup>a</sup> Victoria Jiménez, como ayudante técnico de laboratorio, numerosos becarios predoctorales americanos y asiáticos, así como postdoctorales españoles (Javier Benavente, Eduardo Páez, Francisco Rodríguez, Dolores Rodríguez, Juan Ramón Rodríguez, Margarita Díaz-Guerra, Agustín Portela) y profesores visitantes (Luis Carrasco, Gabriella Santoro). También, en esta época, establece colaboración con los grupos de Ángel Pellicer y Manuel Perucho en Nueva York, con quien lleva a cabo estudios pioneros en transfección de material genético vírico y su inhibición por interferón.

Las investigaciones de esta época fueron muy productivas, ya que consiguió demostrar mecanismos de resistencia y de sensibilidad de los virus a los interferones, identificando productos víricos que interfieren con la acción de los interferones, el papel de las prostaglandinas en la acción antivírica y el efecto de los antiinflamatorios en el aumento de la patogenicidad vírica. Descubrió RNAs de bajo peso molecular como reguladores de la traducción. Demostró el modo de entrada por fusión del virus *vaccinia* con la célula y cómo los RNA víricos se incorporan a los ribosomas. Identificó la enzima ATPasa-dependiente de DNA como regulador de la expresión génica del virus. Estableció un sistema de expresión regulada de genes celulares por la polimerasa del bacteriófago T3. Estableció el primer sistema de seguimiento, con un marcador fluorescente, de la infección vírica en tejidos animales. Consiguió

una infección vírica persistente y desarrolló nuevos vectores como vacunas recombinantes más seguras contra distintas enfermedades, demostrando el papel de mutaciones espontáneas en la patogénesis vírica. Identificó los genes cuyos productos determinan la inducción de respuestas inmunes contra la viruela, generó la primera vacuna potencial contra la viruela basada en proteínas del virus *vaccinia* y aisló el primer anticuerpo monoclonal neutralizante contra el virus. Descubrió que la inmunización combinada con dos vectores distintos (*prime/booster*) aumenta considerablemente la respuesta inmune celular frente a un antígeno y produce protección contra el patógeno de la malaria. Estableció el ensayo del ELISPOT para cuantificar a los linfocitos CD8+ específicamente activados en procesos de vacunación. Estos procedimientos de inmunización combinada de vectores han tenido gran impacto científico y se están aplicando en ensayos clínicos contra tumores y patógenos.

En 1980 el Doctor Esteban Rodríguez junto con otros españoles fundan en la Casa de España en Nueva York, la primera Asociación de Licenciados y Doctores en los Estados Unidos (ALDEEU), de la que fue su Presidente, con la finalidad de contribuir a la divulgación de la cultura científica y humanista de los españoles en los Estados Unidos, para afianzar los lazos culturales y comerciales entre ambos países. El Doctor Esteban Rodríguez organiza en la Casa de España y en el Spanish Institute durante una década, ciclos de conferencias sobre Ciencia y Desarrollo Científico, que sirvió como foro de encuentro y tuvo mucho éxito entre los científicos y humanistas españoles asentados en Nueva York. En estos encuentros participaron destacados científicos españoles trabajando en los EE.UU. en temas de ciencias de la vida, matemáticas, ingenierías, astrofísica e informática. Estos encuentros tuvieron un invitado de honor, nuestro Premio Nobel Severo Ochoa, que vivía en la isla de Manhattan. El Doctor Esteban Rodríguez recuerda que a Don Severo le gustaba mantener reuniones con los científicos españoles invitándolos algunas veces a cenar y aconsejándoles que si algún día regresaban a España «no quemaran sus naves», como hizo Hernán Cortés.

En 1987 el Doctor Esteban Rodríguez fue nombrado Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y en 1992, tras una estancia de 22 años en el extranjero, regresa a España para dirigir el nuevo Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC,

cargo que ocupó durante 11 años. En un período corto reclutó excelentes líderes científicos y el Centro adquirió prestigio internacional como lugar de excelencia en investigación biotecnológica en las áreas de salud humana y animal, agricultura y medio ambiente. Ya en el año 2002 el personal del CNB había ascendido a 641 (13 por 100 funcionarios), con un 10 por 100 de científicos extranjeros, una financiación de unos 25 millones de euros de los cuales más del 70 por 100 procedía de proyectos competitivos (204 proyectos concedidos en 2002), con una media de 200 publicaciones anuales en revistas de alto índice de impacto (media de 6,2 en 2002), con más de 150 seminarios anuales, realizando más de 50 patentes y presentando numerosas tesis doctorales. Durante el mandato del Doctor Esteban Rodríguez, el CNB desarrolló servicios pioneros en España de genómica, proteómica, bioinformática, microscopía de alta resolución, animalario, invernadero, cultivos de contención biológica P-3, que han servido de referencia a otros centros de investigación, estableció el mayor convenio económico que se conoce en la investigación científica española entre un organismo público y una empresa farmacéutica y también puso en marcha el proyecto de construcción del nuevo edificio que albergará los grupos involucrados en nuevas tecnologías y empresas «spin-offs», que terminará su construcción en 2006. En los períodos 1995-1999 y 2000-2004, el Centro fue evaluado por Comités Científicos Internacionales que lo consideraron como «centro de excelencia en biotecnología», con un nivel de igualdad científica con los mejores centros internacionales de investigación. Este fue el objetivo perseguido por el Doctor Esteban Rodríguez desde su regreso a España.

Las investigaciones del Doctor Esteban en el CNB se han centrado en el conocimiento de la biología molecular de virus patógenos para desarrollar procedimientos que permitan el control de enfermedades infecciosas. Sus descubrimientos sobre la biología del virus vacunal, que fue utilizado como vacuna para erradicar la viruela, le ha servido para generar posibles vacunas contra el SIDA, la malaria y la leishmaniosis. Ha sido pionero en el campo de las vacunas al desarrollar y optimizar procedimientos de inmunización combinada de vectores (*prime/booster*), que aumentan considerablemente la respuesta inmune celular y confieren protección frente a distintos patógenos. Estos protocolos de vacunación están siendo experimentados en ensayos clínicos de fase I/II frente a patógenos y cáncer. Su grupo está participando en el

programa EuroVac de desarrollo de una vacuna europea contra el SIDA, habiendo generado dos vacunas contra los subtipos B y C del VIH, los más prevalentes de todos los casos de SIDA que se experimentarán en Europa y en los Estados Unidos en los próximos años. Actualmente ha iniciado el desarrollo de nuevas vacunas contra hepatitis C y cáncer de próstata.

Han sido también pioneras las contribuciones científicas sobre el modo de acción de los interferones, potenciando el interés clínico de estos fármacos como agentes antivirales y antitumorales. Estudios recientes en su laboratorio han demostrado el papel que varios de los genes inducidos por los interferones actúan como reguladores de la muerte celular programada (apoptosis), lo que servirá para establecer pautas terapéuticas más eficaces en el uso de los interferones en pacientes con tumores y en terapia génica.

Las contribuciones científicas del Doctor Esteban Rodríguez representan más de 200 trabajos publicados en revistas internacionales de gran impacto (Nature, Proceedings National Academy of Sciences USA, Genes Development, Journal of Biological Chemistry, Journal of Virology, Virology, Journal of Immunology, Molecular Cellular Biology, Oncogene, etc.), y más de 200 comunicaciones en congresos nacionales e internacionales.

Para la financiación de sus investigaciones, el Doctor Esteban Rodríguez ha conseguido 46 proyectos competitivos. En los Estados Unidos fueron financiadas por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y la Fundación Nacional de las Ciencias (NSF). Desde su regreso a España, sus investigaciones están siendo financiadas por el NIH, la Unión Europea, el Plan Nacional de Investigación y Desarrollo, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Comunidad Autónoma de Madrid, Fundación para la Investigación sobre el Sida (FIPSE), y varias empresas. En el año 2005 su grupo fue elegido por la Fundación Marcelino Botín para realizar investigaciones en vacunas contra enfermedades prevalentes, con financiación por cinco años. Además, su grupo ha sido también seleccionado en 2005 por la Fundación Bill y Melinda Gates para el desarrollo de una vacuna contra el SIDA en los próximos cinco años. El grupo del Doctor Esteban Rodríguez ha generado dos vacunas contra el VIH/SIDA, para los subtipos B y C que representan cerca del 80 por

100 de todos los casos de SIDA. Una de ellas para el subtipo B ha sido ya envasada en viales y los ensayos clínicos en fase I con pacientes seropositivos se iniciarán en varios centros europeos en el primer trimestre de 2006; la otra vacuna para el subtipo C ha sido aprobada su financiación por el NIH para la realización de ensayos clínicos en fase I/II en Europa y en los Estados Unidos en el período 2006/2007, encontrándose actualmente en fase de producción. El Doctor Esteban Rodríguez ha presentado solicitud de patente para ambas vacunas y está en proceso la firma de un convenio de licencia no exclusiva de dichas vacunas entre el CSIC y la Fundación EuroVacc. También el grupo del Doctor Esteban Rodríguez ha generado una vacuna contra leishmaniosis, cuya solicitud de patente ha sido ya presentada.

En el laboratorio del Doctor Esteban Rodríguez en el CNB se han formado estudiantes de varias nacionalidades y recibe periódicamente profesores visitantes. Ha dirigido 21 Tesis Doctorales y actualmente trabajan en su laboratorio 16 becarios, pre y postdoctorales, de seis distintas nacionalidades (cuya foto de grupo recogió la revista *Tiempo* en su publicación del 12 de diciembre de 2005 en el reportaje «Las vacunas que vienen»). Participa en actividades académicas con la Universidad Autónoma de Madrid, de la que es Profesor Honorífico, organizando el curso de Enfermedades Infecciosas y Sistema Inmune.

El Doctor Esteban Rodríguez es miembro de prestigiosas sociedades internacionales y nacionales, tales como: American Society of Microbiology, American Society of Virology, British Society of Microbiology, Harvey Society, New York Academy of Sciences, Sociedad Española de Microbiología, etc. Es miembro editorial de varias revistas y evaluador de artículos de revistas tan prestigiosas como *Science*, *EMBO J* y *J. Virol.*, y miembro evaluador de proyectos nacionales e internacionales. Ha participado y participa en diversos Comites Europeos, entre ellos, es miembro del grupo de expertos que asesora a la OMS en vacunas y agentes biológicos.

Ha impartido más de cien conferencias en diversos países. Ha organizado congresos internacionales, cursos y workshops: Presidente, XI International Poxvirus and Iridovirus Meeting, Toledo, 1996; Presidente, Fifth European Conference on Experimental AIDS Research (2000), Madrid, y Co-Presidente «II European Virology Congress (EuroVirology-2004) en Madrid.

Ha obtenido varias distinciones científicas, entre ellas, el premio del Consejo de Salud de Nueva York, premio de la Universidad del Estado de Nueva York; en España fue nombrado Farmacéutico del Año en 1995, obtuvo el Premio IBERDROLA de Ciencia para Profesores Visitantes. Como anecdótico, le fue concedido en 1996 el premio Nobel del Humor con la Golondrina de Química. Ha sido Fundador y Presidente de la Asociación de Profesionales Españoles en los Estados Unidos (ALDEEU). Es fundador y miembro de la Fundación Europea contra el SIDA (EuroVacc). En 2005 fue elegido Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

## COMENTARIOS AL DISCURSO

En su discurso el Doctor Esteban Rodríguez nos ha relatado cuáles son las enfermedades prevalentes en el siglo XXI y las herramientas que disponemos para su control. Es indudable que la humanidad, cuya población supera ya los seis mil millones, está continuamente expuesta a patógenos, muchos de ellos desconocidos y para los cuales aún no disponemos de medidas de control y otros conocidos de los que disponemos de vacunas eficaces, aunque algunas de ellas no se producen en cantidad suficiente para alcanzar a toda la población. Como nos ha indicado el Doctor Esteban Rodríguez, la OMS lleva a cabo de forma admirable un seguimiento en todos los continentes del control de todas aquellas enfermedades para las que disponemos de vacunas eficaces, como la difteria, el tétanos, la tosferina, la poliomielitis, las hepatitis A y B, *hemophilus influenzae*, sarampión, rubéola, paperas y varicela. Es probable que en algunos países se inicien en el año 2006 las inmunizaciones con las nuevas vacunas contra las diarreas producidas por el rotavirus y contra el cáncer de cuello de útero causado por el virus del papiloma humano, responsable del 70 por 100 de los tumores de cerviz o cuello de útero. Cada año se producen 500.000 casos nuevos de cáncer cervical y 290.000 muertes en el mundo. El Doctor Esteban Rodríguez nos ha expuesto claramente que tenemos que avanzar en nuestras investigaciones y que hace falta un esfuerzo global para reducir la mortandad causada por las pandemias que nos ha relatado. Sólo tenemos que mirar a nuestro alrededor para observar que el SIDA ha producido más de 22 millones de muertes, con más de 40 millones de personas infectadas, 5 millones de casos en el 2005 y unos 150.000

infectados en España; que el parásito que causa la malaria infecta a más de 300 millones de personas anualmente, con una tasa de mortandad de unos 3 millones de muertes, mayoritariamente en niños; que la tuberculosis es una de las infecciones que más muertes produce por año, con una tasa de unos 2-3 millones de personas y que ha aumentado su virulencia debido a la resistencia del *Micobacterium* a los antibióticos; que unos 12 millones de personas están infectadas con *leishmania*; que entre el 1-3 por 100 de la población está infectada con el virus de la hepatitis C y que muchos desarrollarán tumores hepáticos; que unas 500.000 personas mueren anualmente en los Estados Unidos por cáncer, más de 1.500 por día, con unos 5 millones de defunciones desde el año 1990 y la predicción es que para el año 2005 se produzcan cerca de 15 millones de muertes por cáncer. Si a ello añadimos las pandemias anuales de gripe y el miedo a sufrir una nueva pandemia de gripe aviar para la que no tenemos vacuna con predicciones pesimistas de que puede causar entre 150-300 millones de muertes, entendemos el por qué el Doctor Esteban Rodríguez ha elegido para su discurso de ingreso en esta Academia el tema de los interferones y vacunas como control de enfermedades prevalentes.

En su disertación, el Doctor Esteban Rodríguez nos ha llevado de la mano para adentrarnos en el mundo de los agentes biológicos que juegan un papel clave como primera línea de defensa del organismo contra los patógenos, destacando a los interferones como agentes antivirales y antitumorales. Nos ha ilustrado cómo los interferones fueron descubiertos, su naturaleza, los pasos que se siguieron para desentrañar la cascada de señalización, su modo de acción y cómo las investigaciones del Doctor Esteban Rodríguez y su grupo han contribuido a demostrar el sitio de acción. También nos ha revelado los mecanismos de evasión que tienen los virus RNA y DNA para escapar de la inhibición por interferón, habiendo identificado cómo varios genes virales y celulares interceptan la acción de la enzima proteína quinasa PKR, clave en la inhibición de la síntesis de proteínas y en la inducción de apoptosis. También nos ha demostrado la acción de otros genes inducidos por los interferones, como el sistema 2-5A sintetasa/RNasa L que juegan un papel relevante en el control de infecciones y tumores y cómo sus investigaciones con la tecnología de los «microarrays» están identificando otros genes celulares que intervienen en el proceso de muerte celular por apoptosis. Como nos ha comentado, lo que en un principio

fueron moléculas prometedoras, hoy en día se utilizan los interferones en clínica contra varias patologías infecciosas y tumorales. Debido a que los interferones destacan también por su acción inmunomoduladora, y que actualmente se está combinando a los IFNs y otras citoquinas con adyuvantes y vacunas para potenciar la respuesta inmune frente a determinados antígenos y así expandir la población de células B y T protectoras, la segunda parte del discurso del Doctor Esteban Rodríguez se ha centrado en la utilización de vacunas como complemento a los IFNs, como estrategia para aumentar las defensas del organismo contra patógenos y tumores. Nos ha hecho un repaso en la historia desde que Jenner demostrara la práctica de vacunación contra la viruela, la contribución española en vacunación contra la viruela en las colonias de ultramar por la famosa expedición dirigida por el Doctor Balmis, para ir desentrañando los misterios del virus que causó la más devastadora de las enfermedades humanas, desde su estructura, replicación en las células, morfogénesis, atenuación, hasta su aplicación como vector para insertar nuevos genes y demostrar que estos virus recombinantes se pueden utilizar como vacunas seguras contra distintas enfermedades. Nos ha ilustrado con su contribución en el desarrollo de procedimientos de vacunación con vectores heterólogos (*prime/booster*) que aumentan la respuesta celular y memoria de linfocitos CD8+ e inducen protección frente a malaria y leishmania, y su aplicación actual en ensayos clínicos contra distintos patógenos y tumores. También nos ha indicado que las vacunas futuras van en la dirección de modificar genéticamente a los vectores, por inactivación de genes virales que interfieren con el sistema inmune y así conseguir vectores de segunda y tercera generación con mayor capacidad de inducir una respuesta humoral y celular protectora, especialmente contra el VIH/SIDA. Finalmente, el Doctor Esteban Rodríguez nos ha comentado la necesidad de transferir la investigación básica al sector empresarial y proteger las invenciones mediante patentes, una asignatura pendiente en la investigación biomédica de nuestro país.

No voy a insistir en el interés del tema porque después del discurso que acabamos de escuchar, más comentarios por mi parte serían un esfuerzo vano.

Paso a exponerles algunas pinceladas de nuestro nuevo Académico como persona, sus afectos y aficiones.

Los que como yo, conocemos en su faceta humana al Profesor Esteban Rodríguez, sabemos que es un hombre con una enorme simpatía personal que le hace gozar de gran popularidad en los ambientes que frecuenta o ha frecuentado. Por su carácter optimista, polifacético y extrovertido y por su gran capacidad comunicativa, hace amigos con gran facilidad. Destaca por ser emprendedor, autodisciplinado y exigente consigo mismo. En Mariano, el trabajo eficaz va unido a grandes dosis de resolución y perseverancia. Es imaginativo, inquieto e incansable y, como buen científico, posee un extraordinario poder de observación. Posee generosidad innata, espíritu de participación y gran capacidad de compartir con los demás.

Muy apegado a la vida familiar a la que dedica todo el tiempo que le dejan sus ocupaciones, es sensible y afectuoso. Pasó su infancia en su pueblo natal, Villalón, un hermoso pueblo de la Tierra de Campos en pleno corazón de la meseta castellana, en el seno de una familia numerosa de seis hermanos, cuatro hermanas (Ana, Mariluz y las mellizas Rosi y Chus) y un hermano (José Luis). Villalón es famoso por sus mercados de quesos y productos de la tierra, que tuvo su esplendor en los siglos XVI-XVII. Desde muy pequeño se dejó influir por su padre don Victorino Esteban, farmacéutico, por el uso de los medicamentos en su misión de paliar y curar enfermedades. Tuvo en su madre, doña María Victoria Rodríguez, maestra del pueblo, el referente de la enseñanza de las primeras letras. Estudió en las escuelas públicas del pueblo donde destacó por su facilidad para aprender y por su afición por los deportes. En los fines de semana, en esta época, ejerció de monaguillo en la iglesia parroquial. Durante el verano y como premio a sus estudios, sus padres, ambos burgaleses, le permitían entretenerse ayudando a los agricultores en las faenas del campo en la casa de sus tíos en Tórtoles de Esgueva (Burgos). La siega de la cebada y del trigo, la trilla, la formación de la parva y la recogida del grano, junto con la convivencia con los jornaleros, eran algo que le fascinaba.

En sus años de bachillerato es cuando interviene en los primeros juegos deportivos de la Federación de Atletismo de Palencia donde, el entonces Mariano adolescente, se proclama campeón en 100 metros lisos, salto de longitud y 4 × 100 metros lisos, y obtiene el I Trofeo de Juventudes, que guarda en su casa en un lugar muy preferente.

Ya en Santiago de Compostela, durante su carrera, participó en los Juegos Nacionales de Farmacia en Madrid y fue el único de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago que ganó una prueba; obtuvo el primer puesto en los 100 metros lisos. Con este triunfo culmina su participación en competiciones de atletismo. Mariano sigue siendo un apasionado de los deportes, cultivando el ejercicio físico como actividad diaria de mantenimiento, así como un consolidado bailarín y anfitrión animoso (distinguiéndose en actos sociales, congresos y durante su mandato en el CNB con las tres fiestas anuales que organizaba, de Navidad, carnaval y barbacoa de verano, que sirvieron como foro de encuentro social del personal del Centro).

Está casado con María Victoria Jiménez Tentor desde hace veinticinco años, mujer inteligente y atractiva que, como él, derrocha simpatía y optimismo y es también su compañera en las tareas científicas. María Victoria tiene una voz bellísima para el canto, y fue en esta faceta cuando se conocieron en Londres, formando ella parte de un grupo musical que dirigía. A su llegada a Nueva York quiso adaptarse al horario intensivo de su marido en el laboratorio. Se puso a realizar tareas técnicas en cultivos celulares en el laboratorio de Mariano, logrando su reconocimiento como ayudante superior de laboratorio (ATL) por la Universidad Estatal de Nueva York. Lo que en un principio tomó como prueba de corta duración, le resultó interesante y lo sigue realizando con gran entusiasmo y eficacia. En Nueva York nacieron sus dos hijos, Julia y Jorge, a los que adoran sus padres y que son un pilar en las relaciones familiares. Julia ha terminado la carrera de Magisterio en lengua extranjera y estudia 4.º de Psicopedagogía en la Universidad Autónoma de Madrid, y Jorge estudia 2.º de bachillerato en ciencias de la salud.

Señor Presidente, Señoras y Señores Académicos, señoras y señores.

Con estas palabras he pretendido dejar clara las facetas científica y humana del Profesor Mariano Esteban Rodríguez. Creo que les he mostrado los elementos necesarios para darles a conocer que quien hoy se incorpora a nuestra Academia es un hombre de Ciencia cuya dimensión intelectual está en consonancia con la amplitud, complejidad y el intenso servicio social de las Ciencias Farmacéuticas. Él sabe que este acto de toma de posesión como Académico de Número es una confirmación de su deseo de colaboración.

Los miembros todos de nuestra Academia se alegran ante la incorporación de una persona que cuenta con una vida plena de cualidades y méritos hasta límites insospechados. La satisfacción que nuestro nuevo colega pueda sentir en estos momentos por el galardón de pertenecer a esta Real Academia con la medalla número 33, es paralela a la que sentimos todos los que le recibimos.

Querido Doctor Esteban Rodríguez, con la esperanza de que este acto sea el principio de importantes y fructíferas colaboraciones, en nombre de todos los Académicos de la REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA a quienes ahora represento, y en el mío propio, me es muy grato darle la bienvenida, expresarle mis profundos sentimientos de admiración y afecto, y felicitarle por su impresionante trayectoria científica, plenamente dedicada a la búsqueda de la verdad para colaborar en la lucha contra la enfermedad. Su ingreso representa una exigencia nueva porque adquiere desde hoy un compromiso formal con nuestra Real Corporación. Deseo de todo corazón que su permanencia entre nosotros sea fecunda y dichosa, tanto para su satisfacción personal como para el avance del conocimiento científico y el prestigio de nuestra Academia.

He dicho.