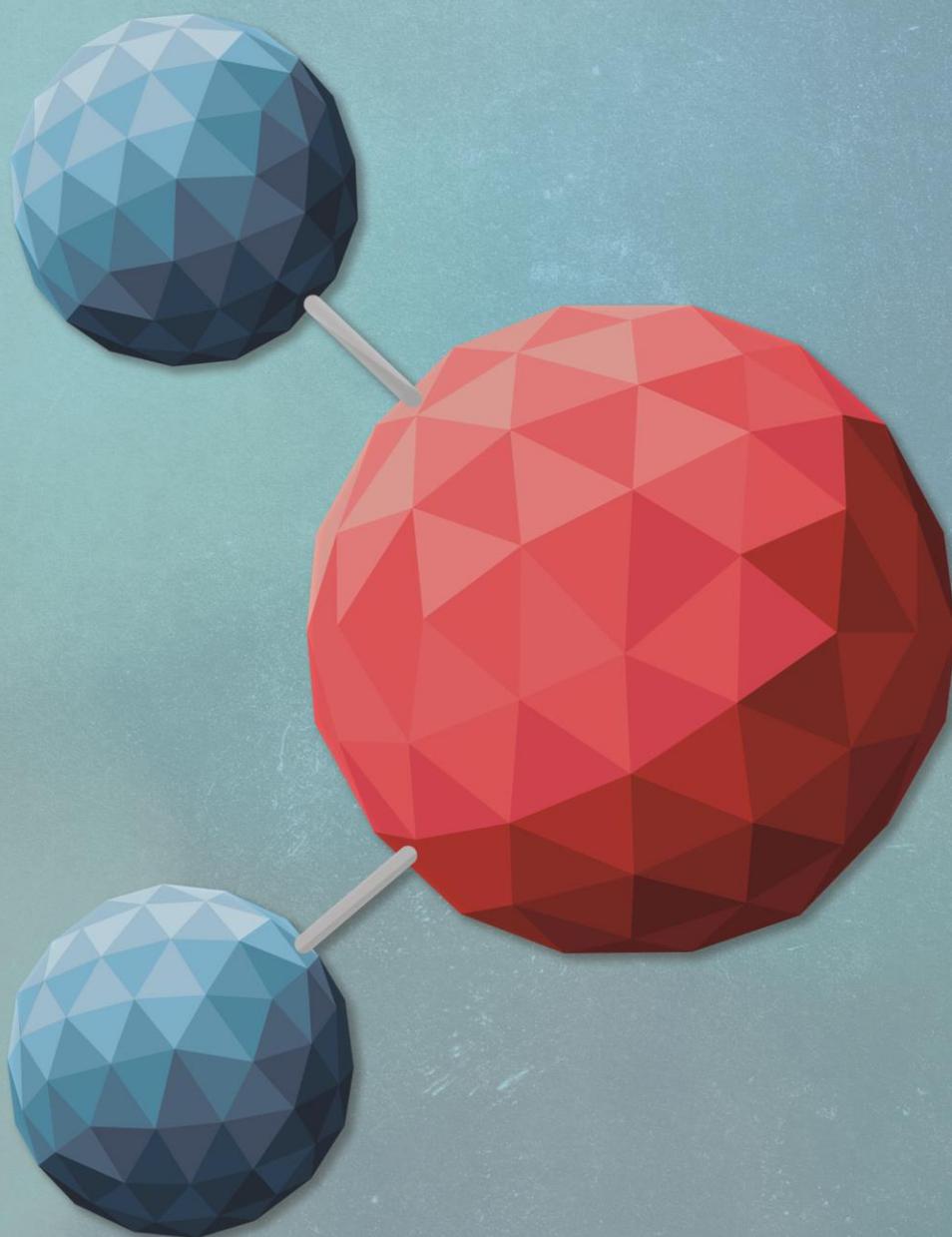


MOLEQLA

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

·Número 21·



Portada

Carmen Santisteban Trigo y María Manuela Valverde

Logotipo y Título de la revista

Juan Manuel García Arcos, Rafael Hoyos Manchado y Rafael Iigo

Roció Escudero Ávila, Inés Maldonado Lasunción y Javier Revello Sánchez

Plantilla de la revista

Norberto Díaz Díaz

Editores de las secciones que aparecen en este número

MoleQla Deporte: Alberto Grao Cruces

MoleQla Forense: Paula Gómez Álvarez

MoleQla Instituto: María Reyes de la Vega Sánchez

MoleQla Celular: Guillermo López Lluch

MoleQla Nanotecnología: Ana Paula Zaderenko Partida

MoleQla Patrimonio: María Pilar Ortiz Calderón

MoleQla Farmacéutica: Matilde Revuelta González

MoleQla Química: Patrick J. Merling

MoleQla Energía: Juan José Gutiérrez Sevillano

Responsables de maquetación de las secciones que aparecen en este número

Cristina Guillén Mendoza

Almudena Sánchez García

Alina Georgiana Ioja

Juan Antonio del Castillo Polo

Maquetación Global

Rafael Rastroero Prieto

Información sobre todas las secciones de MoleQla en <http://www.upo.es/MoleQla>

Editores

Sofía Calero Díaz

Ana Paula Zaderenko Partida

Alina Ioja

Juan Antonio Anta Montalvo

Patrick J. Merkling



ISSN 2173-0903

Editado el 21 de Marzo de 2016

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

Un año después me encargan de nuevo escribir el Editorial del número de Primavera de MoleQla y este año me sorprende la tarea mientras me encuentro trabajando en la patria de El Bosco, Spinoza y Erasmo de Rotterdam. Todos ellos considerados figuras adelantadas a su tiempo, e insignes representantes de los valores del humanismo y la razón frente al oscurantismo y los prejuicios de una sociedad medieval. Los Países Bajos, a pesar de ser un pequeña nación surgida probablemente en uno de los lugares más inhóspitos de Europa, acechada constantemente por la amenaza de las aguas cruzadas del Mar del Norte y del Rin, caída en lo más bajo de un pantano gigantesco por el que desaguan los aluviones de Germania y donde descargan las tormentas del Atlántico, y vapuleada en sus inicios por las hordas inquisitoriales del Duque de Alba; supo a pesar de todo ello (o quizás gracias a ello) convertirse en una de las naciones más prósperas, tolerantes, avanzadas e influyentes de Occidente. Usando una terminología puramente científica, si definiéramos un cociente (influencia histórica)/superficie (IHS) o (influencia histórica)/población (IHP), las *Netherlands* serían probablemente una de las naciones con los índices IHS o IHP más altos del Mundo.

¿Y cómo se me ocurre relacionar los Países Bajos con el número de Primavera de MoleQla? ¿Será porque el gélido viento de Eindhoven me hace implorar porque llegue el buen tiempo de una soberana vez? La verdad es que la Primavera es la estación en la que la luz vuelve al Hemisferio Norte, y los tiempos de El Bosco, Spinoza y Erasmo trajeron la luz a la sociedad europea de los siglos XVI y XVII. Ellos fueron defensores y valedores de la razón, el humanismo y la libertad intelectual en un mundo en el que todavía las creencias religiosas impregnaban todos los ámbitos del saber y de la organización de la sociedad. Y es que todavía hoy en día los que creemos que la ciencia y el humanismo deben ser los motores del progreso tecnológico y social, hemos de luchar día a día para erradicar prejuicios y creencias basadas en supersticiones y sentimientos subjetivos. Uno de los artículos de este número lleva por título “Inmunizando frente a los prejuicios antivacunas”. Otro “Riesgo y Vulnerabilidad: Conocer para proteger”. Y es que sin duda *inmunizar* y *conocer para proteger* sean probablemente dos de las principales tareas que un científico y un humanista debieran siempre tener presentes. Os animamos a que leáis el nuevo número de MoleQla desde esta perspectiva. Puede que incluso algún artículo “...will chill you”.

El equipo editorial de MoleQla y todos los que la hacen posible estación tras estación os desean unas muy felices, luminosas e ilustradas vacaciones de Primavera.



Juan Antonio Anta
Editor de la Revista MoleQla

ÍNDICE

1. MoleQla Deporte

1.1 Prevención de enfermedades crónicas desde el área de Educación Física y Deportiva. Una propuesta educativa

2. MoleQla Forense

2.1 La Inyección Letal

2.2 Psicópatas entre nosotros

2.3 Una muerte dulce

3. MoleQla Instituto

3.1 ¿Cuánta vitamina hay en mi zumo?

4. MoleQla Celular

4.1 La vida rural: ¿Enemiga del asma?

4.2 CRISPR-Cas9 y... ¿Bebés a la carta?

4.3 El sistema inmune y el sexo

4.4 El abuso de cocaína y su efecto en el sistema inmune y citoquinas del suero

4.5 Inmunizando contra los prejuicios antivacunas

5. MoleQla Nanotecnología

5.1 Biosíntesis de Quantum Dots

5.2 Nanotecnología para el tratamiento de la artritis reumatoide

5.3 Aplicaciones biomédicas del grafeno

5.4 Nanomedicina: Nuevas teraÑias para el tratamiento de la diabetes

6. MoleQla Patrimonio

6.1 Técnicas espectroscópicas aplicadas al análisis de pigmentos afectados por cambios degenerativos, producidos por el fuego

6.2 Riesgo y Vulnerabilidad: Conocer para proteger

6.3 Caracterización de la corrosión del edificio metálico de Badajoz (antiguo Mercado de Abastos) por las técnicas SEM-EDX y XRD

7. MoleQla Farmacéutica

7.1 El Selank, más que un ansiolítico

7.2 Diseño racional de fármacos en el tratamiento de úlceras gástricas

8. MoleQla Química

8.1 Superficies revolucionarias: Superhidrofóbicas

8.2 Extracción de la cafeína con CO₂ supercrítico

8.3 The discovery of Quarks

8.4 Biopolímeros, un vistazo del presente al futuro

9. MoleQla Energía

9.1 Cryopreservation, it will chill you

Prevención de enfermedades crónicas desde el área de Educación Física y Deportiva. Una propuesta educativa

Ángel Moisés Román Ávila

Resumen— La prevención de enfermedades ha tomado especial importancia en los últimos años, así como la importancia de la escuela como agente capaz de establecer y mantener conductas saludables a lo largo de la vida del alumno. Las nuevas tecnologías unidas a los centros de interés y el trabajo cooperativo de los alumnos pueden servir como una herramienta muy potente para conseguir dichos fines.

Palabras Claves— Conductas saludables, nuevas tecnologías, actividad física y salud, intervención educativa.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas son un gran problema médico actual que, de forma global, generan altos gastos económicos derivados de su tratamiento. Es considerado como un problema de gran impacto sobre la salud pública a nivel mundial y por ello es necesario actuar no solo desde la prevención secundaria y terciaria, sino también desde la prevención primaria.

Partimos de una situación donde el 51% de la población adulta española tiene sobrepeso y donde el 28% tiene obesidad [1]. Esta enfermedad tiene grandes asociaciones con factores de riesgo cardiovascular como la diabetes, la hipertensión o la hipercolesterolemia, entre otras. Concretamente el 13,8% de la población española tiene diabetes pero peor aún es que el 6% de la población tiene diabetes y no es consciente de ello [2]. No obstante, todas las enfermedades crónicas no tienen por qué darse en la edad adulta y ahí podemos encontrar el dolor crónico de espalda, tan extendido entre los niños y adolescentes en edad escolar [3].

Actualmente se ha conseguido aumentar nuestra esperanza de vida aproximadamente de 60 a 80 años en los últimos 50 años. Además hemos conseguido descender el número de víctimas mortales derivadas de enfermedades y esto es visto como un logro desde el punto de vista de la medicina. No obstante, lo cierto es que el precio a pagar por esos años más de vida es la calidad de vida, la cual se ve mermada en los últimos años de la vida de una persona. Dar años a la vida y vida a los años es el gran reto del futuro en la medicina, idea que soporta el prestigioso cardiólogo Valentín Fuster. Para este autor, por lo tanto, el éxito de la medicina en el futuro es la prevención.

En este sentido, hace poco más de una década surgió uno de los artículos más discutidos en cuestión de prevención de enfermedades cardiovasculares donde Wald y Law [4] propusieron la creación de una polipíldora que contenía bajas dosis de vitaminas, antihipertensi-

vos, reguladores para el colesterol, entre otros y que se administraba a la población adulta mayor de 55 años de forma diaria. Con ello conseguirían reducir hasta en un 80% las enfermedades cardiovasculares. En respuesta a este polémico artículo surgió la revisión de Fuiza-Luces et al. [5] donde se fundamentaba que la polipíldora real para la prevención de enfermedades era el ejercicio físico. Este artículo defiende que el ejercicio físico no solo previene de enfermedades cardiovasculares (como defendían Wald y Law) sino que previene de otras muchas enfermedades como la Diabetes, la osteoporosis o incluso aspectos como la mejora de la inmunología y el envejecimiento. Además, tratan el ejercicio físico como una herramienta accesible a toda la población y de bajo coste económico.

Valentín Fuster entiende la prevención desde una perspectiva educativa y trata de crear patrones de conductas saludables a edades tempranas desde la escuela [6]. Soporta que los niños tienen una mayor influencia sobre los adultos que los adultos sobre los niños. Para él, el ejercicio físico y la alimentación son los pilares básicos a trabajar en la escuela para crear conductas saludables permanentes. En España ya son más de 100 centros educativos los que están inmersos en los proyectos de su fundación "SHE" (Science, Health and Education).

No obstante, sus proyectos están basados en libros de texto y actividades que quizás, aunque están siendo efectivos, no respondan a la actualidad pedagógica. Por ello, el objetivo de este artículo no es más que dar una aportación bajo su misma filosofía con metodologías cooperativas y la consecución de retos de manera transversal en el currículo de Educación Física.

2. PROPUESTA EDUCATIVA

La propuesta educativa se desarrolla dentro de un proyecto transversal anual, caracterizado por el trabajo cooperativo y la consecución de retos. Éste parte del análisis del contexto como centro de interés del alumnado para conseguir la implicación tanto de ellos como de su entorno. Este proceso queda secuenciado en la *figura 1*.

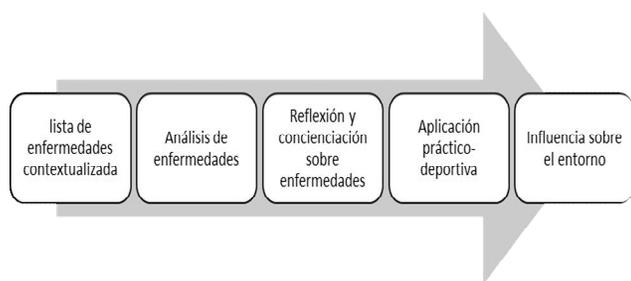


Fig. 1. Secuenciación del proyecto

El objetivo es que la información y las conductas lleguen al mayor número de personas posibles de cualquier edad y en este aspecto no podemos olvidar el potencial de difusión que tienen las redes sociales hoy en día. Por ello la red social Facebook es la herramienta clave para ir desarrollando este proyecto.

En primer lugar es necesario confeccionar un listado de enfermedades utilizando un brainstorming que posteriormente será completada tanto por el profesor como el entorno familiar más cercano del alumno y crivado hasta reducir el listado a enfermedades crónicas. Posteriormente, se deberá analizar la prevalencia de enfermedades incluidas en la lista con el fin de tratar durante el proyecto aquellas en las que se determine mayor prevalencia dentro del grupo clase.

El siguiente paso es proceder a la apertura de una página de Facebook común para todo el grupo clase bajo el título de un lema, en nuestro caso “años a la vida y vida a los años”. Sólo existirá un usuario mediante el cual todos los alumnos realizarán sus aportaciones y distinguirán sus aportaciones con las de otros compañeros firmando su publicación al final del texto. Una vez construida la página empezará propiamente el trabajo de prevención y educación para la salud.

La intervención se realiza con grupos de trabajo cooperativo de aproximadamente 4-5 alumnos y en gran grupo. El alumnado irá aportando contenidos a la página bien sea de contenidos para conocer mejor una determinada enfermedad o cuál es su sintomatología, aportaciones de experiencias personales de los familiares, cómo determinados tipos de actividad física pueden llevar a una prevención primaria o secundaria de una enfermedad determinada, pueden compartir noticias o artículos de otros autores que traten un tema relacionado, etc. En definitiva contenido sobre contexto y prevención de enfermedades a través del ejercicio físico.

Para incentivar la participación de los grupos o del grupo completo se plantea una consecución de retos relacionados con la actividad en la página. Estos retos pueden ser llegar a un determinado número de “likes” en la página en un determinado tiempo, aportar a la página un determinado número de publicaciones, conseguir que personas de su entorno ajenas al grupo comenten sus experiencias sobre una determinada enfermedad, aportar grabaciones o imágenes de miembros del grupo realizando actividad física con sus familiares, etc. Siempre el reto debe ofrecerse cuidadosamente y debe ser acorde con la capacidad de trabajo del grupo ya que si son demasiado

complejos pueden llegar a desmotivarse y si son demasiado simples pueden perder el interés por realizar las actividades propuestas.

De la misma forma que se formulan los retos, éstos deben ser premiados para acentuar su implicación en el proyecto. Para ello utilizaremos actividades complementarias o extraescolares que tenemos incluidas en nuestra programación a principio de curso. Cualquiera de estas actividades por su carácter extraordinario tiene capacidad de motivación, por ello, podemos plantear premiar al alumnado tras conseguir un reto con una actividad de este tipo, que en cualquier caso se iba a dar. Mantener en secreto al alumnado por ejemplo una salida para practicar actividad física en el medio natural en el mes de mayo para ofrecérsela como premio a la consecución de unos retos previos en el mes de marzo puede ser una buena opción para aprovechar ese recurso. No siempre se conseguirá el reto propuesto y esto podría limitarnos pero seguramente más de un reto será conseguido con seguridad en la mayoría de los casos. De la misma forma podemos aprovechar el “desayuno andaluz” en el Día de Andalucía o una salida a la piscina municipal en mayo (Día mundial de la Fibromialgia) donde aprovechemos para experimentar cómo realizan ejercicio estas personas entre otras actividades planificadas. No obstante, no siempre el premio debe ser un acto programado previamente y puede darse en función de los intereses del grupo clase que manejemos.

Normalmente las clases se desarrollarían de manera normal atendiendo al currículo aportado por la legislación vigente pero la secuenciación puede verse modificada en función de las efemérides relacionadas con las enfermedades crónicas. Por ejemplo, quizás me interese trabajar los deportes colectivos en noviembre para potenciar el carácter lúdico de este tipo de actividad física justo el mes donde se encuentra el día mundial de la obesidad. No obstante todas las unidades didácticas estarían relacionadas con la prevención primaria y secundaria y así se les pediría reflexionar en pequeños grupos al alumnado y transmitirlo a los contenidos de la página de Facebook creada.

Por otra parte, el teléfono móvil en este proyecto podría ser una herramienta muy potente y sería necesario autorizar su uso con fines académicos. Actualmente la gran mayoría del alumnado posee un dispositivo móvil propio y si no fuese así el trabajo en grupo permitiría paliar su déficit. El dispositivo móvil es la única herramienta interactiva que se podría utilizar en el patio para las clases de Educación Física y éste nos permitiría realizar aportaciones a la página de manera instantánea, podríamos realizar grabaciones de vídeo o fotos de actividades que se pueden subir a la página y comentar su función y cómo interviene en la prevención de una determinada enfermedad. Pero el máximo potencial de los dispositivos móviles son sus aplicaciones para el registro de datos del entrenamiento entre las que podemos destacar los GPS y los podómetros. A través de ellos podemos extrapolar la actividad física no solo dentro del centro educativo sino fuera del mismo. Podríamos plantear un reto en el cual la clase en su conjunto tuviese que demostrar la realización

de un número de kilómetros o un número de pasos determinado y posteriormente compartir los resultados en la página y comentar sobre sus experiencias. Este tipo de intervenciones ya se han llevado a cabo por Martínez-López et al. en 2012 [7]. No obstante, puede ser que el registro de los datos del podómetro en el dispositivo móvil sea menos susceptible de engaño ya que un podómetro puede ser usado por cualquier familiar o compañero mientras que los jóvenes tienen cierta reticencia a dejar sus propios dispositivos a otras personas por contener conversaciones y elementos privados.

Para poder llevar a cabo este proyecto es necesario ser consciente de que los alumnos son menores de edad y no podemos publicar imágenes sin autorización. Para ello sería necesario pedir una autorización por parte de sus padres a principio de curso para poder utilizar las imágenes con fines educativos y respetar la decisión de los alumnos que no deseen salir en dichas imágenes. No por ello no se puede llevar a cabo el proyecto sino tener cuidado en cualquier caso para que se respete la decisión.

3. CONCLUSIONES

El sedentarismo es la pandemia del siglo XXI y de ello deriva la mayoría de enfermedades crónicas. Es necesario atacar desde la educación para dirigir al alumnado hacia el cambio y mantenimiento de conductas saludables tanto de ellos mismos como de su entorno más cercano. Las redes sociales tienen gran potencial para divulgar información y un proyecto donde se realice una buena gestión de ellas puede influir en su entorno y en su contexto. De la misma forma las herramientas interactivas fuera del aula pueden ayudar a actuar sobre una población cada vez más digitalizada para conseguir reducir los factores de riesgo relacionados con las enfermedades crónicas e influir sobre su entorno.

REFERENCIAS

- [1] F.J. Felix-Redondo, M. Grau, J.M. Baena-Díez, I.R. Dégano, A. C. de León, M.J. Guembe..., D. Fernández-Bergés, "Prevalence of obesity and associated cardiovascular risk: the DARIOS study," *BMC public health*, vol. 13, 2013, pp. 542; DOI 10.1186/1471-2458-13-542.
- [2] F. Soriguer, A. Goday, A. Bosch-Comas, E. Bordiú, A. Calle-Pascual, R. Carmena..., J. Vendrell, "Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study," *Diabetologia*, vol. 55, no. 1, 2012, pp. 88-93; DOI 10.1007/s00125-011-2336-9.
- [3] I. Calvo-Muñoz, A. Gómez-Conesa, J., and Sánchez-Meca, "Prevalence of low back pain in children and adolescents: a meta-analysis," *BMC pediatrics*, vol. 13, 2013, pp. 14; DOI 10.1186/1471-2431-13-14.
- [4] N.J. Wald and M.R. Law, "A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80%," *BMJ*, vol. 326, no. 7404, 2003, pp. 1419; DOI 10.1136/bmj.326.7404.1419.
- [5] C. Fiuza-Luces, N. Garatachea, N.A. Berger, and A. Lucía,

"Exercise is the real polypill," *Physiology (Bethesda, Md.)*, vol. 28, no. 5, 2013, pp. 330-358; DOI 10.1152/physiol.00019.2013.

- [6] J.L. Penalvo, G. Santos-Beneit, M. Sotos-Prieto, R. Martínez, C. Rodríguez, M. Franco..., V. Fuster, "A cluster randomized trial to evaluate the efficacy of a school-based behavioral intervention for health promotion among children aged 3 to 5," *BMC public health*, vol. 13, 2013, pp. 656; DOI 10.1186/1471-2458-13-656.
- [7] E.J. Martinez-Lopez, A. GraoCruces, J.E. Moral-García, and A. Pantoja-Vallejo, "Intervention for spanish overweight teenagers in physical education lessons," *Journal of sports science & medicine*, vol. 11, no. 2, 2012, pp. 312-321.



Ángel Moisés Román Ávila. Obtuvo la Diplomatura en Educación Física en 2012 por la Universidad Cardenal Espínola CEU. Posteriormente recibió el título de Licenciado en Ciencias de la Actividad Física y el Deporte por la Universidad de Sevilla en el año 2014. Continuó sus estudios superiores en la Universidad Pablo de Olavide con el título de Máster en Actividad Física y Salud en el año 2015. Actualmente, cursa el Máster en Educación Secundaria Obligatoria por la especialidad de Educación Física en la Universidad de Cádiz.

La Inyección Letal

Rafael López Rodríguez

Resumen—Este artículo versa sobre la inyección letal, como mecanismo para la ejecución de personas, utilizada principalmente en países tales como Estados Unidos y China. Conoceremos todo lo que a ella engloba, sustancias que lo componen, su función, el procedimiento, la existencia o no de sufrimiento, etc. Un breve escrito que intentará acercarnos más a la inyección letal, tan oída por todos, pero a la vez tan desconocida.

Palabras Clave—Dosis, Inyección, Muerte, Sufrimiento, Sustancias.

1. INTRODUCCIÓN

Hace algo más de un año, descubrí una noticia en un periódico de nivel nacional acerca de este tema. El hecho de que en estos momentos me encuentre estudiando el Grado de Criminología y que el titular invitaba a su lectura (*“Un preso agoniza durante dos horas tras serle administrada la inyección letal”*), [1] no podía dejar escapar la oportunidad de acercarme a la materia tan conocida por todos, pero a la vez muy ignorada.

Todos sabemos que la “inyección letal” es utilizada para acabar con la vida, no sólo de personas, sino también de otros seres vivos, como perros catalogados como violentos o incluso caballos que sufren alguna enfermedad y ya “no tienen valor”; no obstante en este artículo nos centraremos exclusivamente en el ser humano.

Pese a ser mundialmente conocida, no todo el mundo esta al corriente de su composición química, cómo reacciona el cuerpo ante esta inyección, la existencia o no de dolor previo a la muerte, si se puede considerar humanitaria esta muerte.... todas estas cuestiones serán tratadas en este escrito.

La inyección letal, tuvo su origen en el año 1977, desarrollada principalmente como alternativa más humana a la silla eléctrica. Se podría definir de forma escueta como un método de ejecución, de acabar con la vida, que consiste básicamente en inyectar por vía intravenosa y de manera continuada una cantidad letal de un somnífero de acción rápida en combinación con un producto químico paralizante [2]. Para hacerse una idea, este procedimiento es muy similar que se utiliza en los hospitales para administrar una anestesia general, previa a cualquier tipo de operación, pero obviamente las sustancias inyectadas lo son en cantidades letales.

2. SUSTANCIAS QUE LO COMPONEN

Para que la inyección letal tenga el fin que se le presupone se necesita conjuntamente la aplicación de tres sustancias: *Tiopental Sódico*, *Bromuro de Pancuronio* y *Cloruro de Potasio*. Cada uno de ellos produciendo una reacción diferente en el cuerpo y complementándose entre ellas para poder acabar con la vida.

2.1. Tiopental Sódico

El Tiopental Sódico es un barbitúrico de acción muy rápida que en líneas generales provoca la pérdida del conocimiento.

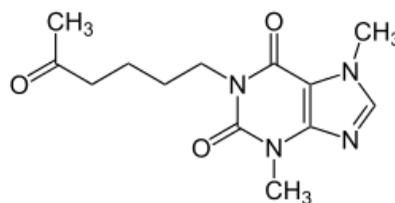


Fig. 1. Fórmula Tiopental Sódico.

El Tiopental Sódico es un medicamento que se utiliza principalmente como anestésico y cuya fórmula se puede observar en la Figura 1. Tiene la capacidad de pasar la barrera hematoencefálica, produciendo una intensa acción depresora y anestésica. Actúa sobre los receptores GABA y como depresor no selectivo del sistema nervioso central. No produce analgesia, sino que realmente deprime la corteza sensorial inhibiendo la conducción ascendente de los impulsos nerviosos hacia el encéfalo, produciendo sedación a corto plazo, disminución de la presión arterial, vasodilatación, arritmias cardíacas, hipotensión endocraneal e intraocular, depresión respiratoria notable, relajación de los esfínteres del cuerpo y broncodilatación entre otros efectos.

2.2. Bromuro de Pancuronio

El Bromuro de Pancuronio es un bloqueador de placa mioneural no despolarizante, que paraliza el diafragma, y por lo tanto, impide la respiración. La fórmula de esta sustancia se puede observar en la Figura 2.

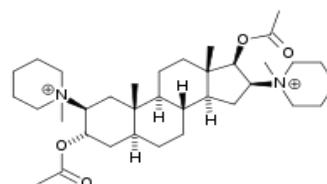


Fig. 2. Fórmula Bromuro de Pancuronio.

Produce relajación muscular y se utiliza durante intervenciones quirúrgicas mayormente en la intubación endotraqueal y en la respiración asistida; así como también tiene ciertos efectos en el sistema circulatorio.

2.3. Cloruro de Potasio

El Cloruro de Potasio provoca la despolarización del músculo cardíaco provocando con ello un paro cardíaco en el ser vivo.

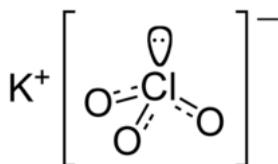


Fig. 3. Fórmula Cloruro de Potasio.

Es un haluro metálico compuesto de potasio y cloro [3]. Su fórmula se encuentra en la Figura 3. Produce efectos severos sobre el músculo cardíaco; altas dosis pueden causar paro cardíaco y una muerte rápida. También en contacto con la piel puede producir severas quemaduras y si se inyecta por vía intravenosa sin diluir, causará serias quemaduras y una muerte lenta y dolorosa.

3. DOSIS LETAL MEDIA

Es interesante, una vez conocido los tres componentes que conforman la inyección letal, conocer en cada uno de ellos cual es su dosis letal media o DL_{50} , entendiéndose por dosis letal, aquella dosis de una sustancia que produce la muerte en un sistema dado, datos que se pueden observar en la Tabla 1.

TABLA 1.
DOSIS LETAL MEDIA

Sustancia	Dosis Letal Media (DL_{50})	Dosis en operaciones quirúrgicas
Tiopental Sódico	5 gramos.	100-150 miligramos.
Bromuro de Pancuronio	100 miligramos.	40-100 microgramos/kg.
Cloruro de Potasio	100 miligramos.	-----

Como bien se sabe, esta la dosis letal varía en función de diferentes factores (sexo, edad, salud, raza...). Por ello, es conveniente para este artículo conocer preferiblemente su dosis letal media DL_{50} , entendiéndose por tal la dosis de un agente químico o físico, que se espera que produzca la muerte al 50% de los individuos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas, teniendo presente que la incorporación de la sustancia al cuerpo humano se hace en nuestro caso de manera intravenosa.

4. FUNCIONAMIENTO

Tal vez la inmensa mayoría ha visto en películas o series una muerte por inyección letal, pero como bien es sabido, eso es ficción y no se asemeja a la realidad. Su

verdadero funcionamiento se puede resumir en tres fases:

4.1. Fase Protocolaria

La persona a la que se le va a administrar la inyección letal es acostado en una camilla con ruedas, sujetándole las muñecas y los tobillos con bandas de correa, pero la cabeza suelta para que pueda ver a sus familiares y testigos, siempre y cuando los cristales de la cámara no sean en una sola dirección, tal y como se muestra en la Figura 4.

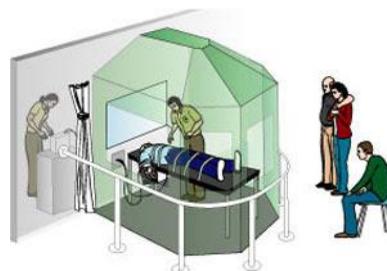


Fig. 4. Sala de ejecución.

Una vez inmovilizado un funcionario de prisión entrenado para esta función le insertan dos tubos intravenosos, uno en cada brazo, los fármacos son administrados por uno y el otro de reserva por si surgen complicaciones, dichos tubos atraviesan una abertura sobre la pared que lleva a una antesala, en la que se encuentra la persona que va a llevar a cabo la ejecución, mediante una "bomba de infusión", dicha bomba, aplica automáticamente y secuencialmente cada una de las tres sustancias [4].

4.2. Fase de Ejecución

En esta fase se lleva a cabo la introducción en el cuerpo humano de las tres sustancias que componen la inyección letal, por vía intravenosa, en un orden y unas cantidades totalmente exactas y precisas para conseguir que toda esta fase sea una ejecución indolora [5].

En primer lugar se administra una dosis potencialmente mortal de tres a cinco gramos de la primera sustancia, el tiopental sódico. Este fármaco induce a la anestesia y por lo tanto, a la pérdida de la conciencia, como si de un coma medicamento inducido se tratase; en primer lugar, este medicamento afecta al cerebro, esta sustancia sirve para pararlo, deshabilitando por consecuencia los sentidos, iniciando un proceso en el que se duerme el cuerpo, y el corazón y la respiración disminuyen su ritmo; este barbitúrico hace efecto en unos 30 segundos desde su administración intravenosa.

En segundo lugar se administra una dosis de 40 a 100 miligramos de bromuro de pancuronio. Este funciona como un medicamento paralizador, su función es paralizar todos los músculos, incluido el diafragma, lo que a su vez lleva a una parada respiratoria, siendo por ello su aplicación crítica, ya que el diafragma es el músculo que se utiliza para respirar, impidiendo que el paciente pueda respirar por si mismo, no obstante el corazón sigue latiendo. En el caso de la dosis administrada en la inyección letal, el bromuro tarda entre 15 y 30 segundos en actuar.

Finalmente, como aún el corazón sigue latiendo, se

administra una dosis de 100 a 160 mEq de cloruro de potasio. Este medicamento, sube los niveles de potasio en la sangre, afectando al ritmo cardíaco, y provocando que el corazón no pueda conducir la electricidad de forma normal induciendo a que se produzca una parada cardíaca. Habitualmente, la muerte tiene lugar en 7 o 10 minutos y ha de ser certificada por un médico.

4.3. Fase de certificación de la muerte

Una vez llevado a cabo la introducción en el orden adecuado y en las cantidades precisas, se deja el cuerpo reposar durante unos minutos (10-15 minutos), y posteriormente un médico homologado comprueba efectivamente la muerte del paciente. Como nota característica, no se le permite a un médico participar en las ejecuciones más allá de la certificación de la muerte, debido a su ética profesional.

En principio, como se ha dicho anteriormente la muerte por inyección letal es un proceso rápido que no debe de durar más de unos 5 minutos, pero es cierto que se han dado casos en los que el paciente no ha fallecido hasta pasado más de 30 minutos, este aumento de tiempo siempre ha ido asociado al sufrimiento por parte del paciente, evitando así uno de los fines principales de la inyección letal: la ausencia de sufrimiento; ya sea o bien por un fallo en la fase protocolaria, un error en la dosis o bien problemas fisiológicos, como por ejemplo una enfermedad en el hígado que impida al organismo metabolizar con rapidez las sustancias químicas administradas [6].

5. EXISTENCIA O NO DE DOLOR

Como se ha comentado anteriormente, este método fue impuesto por razones humanitarias, suplantando otras técnicas para llevar a cabo las condenas a muerte, como eran la famosa "silla eléctrica" o la tradicional "horca"; dándose por hecho que mediante la inyección letal, el paciente no sufría, aunque puede ser, según un estudio de la Universidad de Miami [7], que la inyección letal no sea tan humanitaria, y para ello he dispuesto un esquema con tres posibles errores en la fase de ejecución:

1. Absorción parcial del Tiopental Sódico:
 - El paciente se despierta y siente como el bromuro de pancuriano y el cloruro de potasio empiezan a actuar en el cuerpo.
 - Observa con sufrimiento como poco a poco no puede respirar y justo después un dolor en el pecho propio de un paro cardíaco.
2. El bromuro de pancuriano se absorbe primero:
 - El paciente despierto siente cómo poco a poco se le va paralizand la respiración.
 - Impasible percibe como se ahoga en la más cruel desesperación sin poder hacer nada.
3. El cloruro de potasio se absorbe primero:
 - El paciente despierto percibe como el corazón es incapaz de contraerse, provocando un infarto agudo.
 - El paciente empieza a sufrir un tremendo dolor en el pecho, similar a un dolor precordial.

No obstante existen otras causas, como factores externos o propios del individuo (como una enfermedad en el hígado, mencionada anteriormente), que demuestran que cabe la posibilidad de un sufrimiento extremo producido por incluso un error minúsculo.

6. CONCLUSIONES

A lo largo de todo este artículo, se han expuesto los aspectos más relevantes concernientes a la inyección letal; pudiendo concluir que es la muerte perfecta, ya que ataca a los tres puntos vitales del ser humano: sistema nervioso (cerebro), respiratorio (diafragma) y cardíaco (corazón). Consiguiendo de manera absoluta y total la muerte. Pero sin olvidar, como hemos visto, que aunque la inyección letal puede en teoría ser la forma de acabar con la vida más efectiva y humanitaria posible, en la práctica el más mínimo fallo puede provocar la peor tortura posible, que nadie debería soportar jamás, y menos antes de morir.

En la actualidad la inyección letal es el método de ejecución más habitual en Estados Unidos. De las 53 ejecuciones judiciales que se llevaron a cabo en 2006, 52 fueron por este sistema. Su popularidad radica entre otras causas, en su concepción como alternativa indolora a otros sistemas como la silla eléctrica o la horca [8]. Sin embargo durante la recogida de información e investigación para la realización del artículo no he dejado de encontrar casos, entre ellos el que me motivó a hacer este artículo, en el que los reos condenados a muerte sufrían innecesariamente durante muchos minutos e incluso horas. Por ello, con este escrito quisiera invitar a pensar, no sólo ya si la condena a muerte es adecuada, sino si el método estadísticamente más usado es el adecuado.

REFERENCIAS

- [1] <http://www.elmundo.es/america/2014/07/24/53d0580a22601d81788b457d.html>
- [2] https://es.wikipedia.org/wiki/Inyecci%C3%B3n_letal
- [3] https://es.wikipedia.org/wiki/Cloruro_de_potasio
- [4] <http://www.taringa.net/posts/info/10953847/La-Inyeccion-Letal-Composicion.html>
- [5] http://www.barriozona.com/barriopedia_inyeccion_letal_PRINT.html
- [6] http://www.elmundo.es/elmundosalud/documentos/2007/05/inyeccion_letal.html
- [7] <https://www.youtube.com/watch?v=DBmgEa-TR1E>
- [8] <http://www.batanga.com/curiosidades/4357/inyeccion-letal-la-ciencia-detras-de-las-penas-de-muerte>

Rafael López Rodríguez.

Estudiante del doble grado de Derecho y Criminología de quinto curso.



Psicópatas entre nosotros

Eugenia Torres Marín

Resumen—¿Qué es un psicópata? Dicen las estadísticas que entre el 1 y el 6% de la población posee este trastorno psíquico, lo que significa que lo más probable es que de cien personas que conozcas, al menos uno lo sea, ¿crees que podrías identificarlos en tu entorno inmediato?

Psicópatas. ¿Qué estructura neuronal se enconde tras el comportamiento de estos sujetos? Muchas investigaciones avalan la idea de que la psicopatía responde a una composición cerebral específica. ¿Son elementos bioquímicos concretos los que motivan su conducta antisocial? Lo que también nos haría preguntarnos, ¿eligen estos individuos actuar del modo en que lo hacen o se encuentran determinados bioquímicamente? Este artículo habla de la química del cerebro del psicópata y de los componentes neurobiológicos condicionantes que propulsan la aparición de esta anomalía psíquica.

Palabras Clave— Psicopatía, Cerebro, Psiquiatría, Neuroquímica, Neurobiología.



1. ¿QUÉ ES LA PSICOPATÍA?

2.1. Introducción

En 1809 Phillipe Pines propone la primera clasificación diagnosticada de la psicopatía y la describe como una anomalía psíquica con graves deficiencias en la capacidad afectiva[1].

La definición responde a una conducta aparentemente maniaca por la extravagante frialdad emocional que la caracteriza, pero las facultades cognitivas del sujeto permanecen intactas. F. López Reyes advierte que lo significativo del comportamiento psicopático se percibe sobre todo en la relación de estos sujetos con los demás, ya que en ellas "*se encuentran ausentes las mínimas habilidades que conducen a una relación sincera, predecible y plenamente humana*"[2].

Lo más sorprendente es que, según las estadísticas[3], entre el 1 y el 6% de la población posee esta anomalía psicoemocional. Sin embargo, tiende a asociarse con su expresión más violenta, como la comisión de los delitos más graves y con una conducta criminal extrema. Pero lo cierto es que la mayoría de ellos ni siquiera son delincuentes[2].

Esto nos hace preguntarnos si alguna vez hemos estado o estamos expuestos a la influencia de alguno de estos sujeto. Si así fuera, ¿seríamos capaces de percartarnos de ello?

Los siguientes criterios identificativos quizás sirvan de noción, no solo para entender mejor en qué consiste este trastorno, sino para detectar indicios de la existencia de uno de estos sujetos en nuestro entorno inmediato.

1.2 ÍTEMS IDENTIFICATIVOS

A lo largo de la historia se han creado, tanto para diagnosticar como para investigar la psicopatía, varios procedimientos objetivos de

valoración de la existencia de esta anomalía mental y medir su grado [4]. Entre ellos, uno de los más conocido es el TAP del DSM-III. Aunque también lo son la Escala de Desviación Psicopática (Pd) de Dahlstrom y Welsh de 1960 o la Escala de Psicopatía y Neuroticismo (PN) de Quay y Paterson de 1964, entre otros. Aunque todos estos test resultan útiles, destacan Cleckley y Hare en la postulación de una serie de criterios objetivos precisos:

1.2.1 Los 16 criterios de Hervey Cleckley

Hervey Cleckley fue el pionero de la investigación en psicopatía, proponiendo el primer perfil sólido y detallado del psicópata en su libro *La máscara de la salud* de 1941 [5]. Más tarde, en 1964, cataloga dieciseis criterios identificativos principales de los que siguen sirviéndose investigadores y psiquiatras en la actualidad.

Entre ellos destacan: encanto externo y notable inteligencia, egocentrismo patológico e incapacidad de amar, gran pobreza de reacciones afectivas básicas, vida sexual impersonal, trivial y poco integrada, mentiras, falta de sentimientos de culpa y de vergüenza o amenazas de suicidio raramente cumplidas [6].

1.2.2 La PCL-R de Robert Hare

Por otro lado, Robert Hare [4], otro de los mayores expertos en psicopatía del mundo, desarrolló en 1978, como alternativa al TAP del DSM-III por resultar éste excesivamente laborioso, la Escala de Psicopatía PCL-R.

Esta herramienta de diagnóstico es uno de los instrumentos más fiables y potentes a día de hoy a la hora de evaluar la psicopatía. Al desarrollarla, Hare se basa en los trabajos de Clickley y plantea dos factores influyentes cuantificables en la persona a evaluar[7]:

1. Componente de personalidad, se mide la existencia o no de: encanto superficial y locuacidad, sentimiento de

grandiosidad personal, mentira patológica, manipulación, falta de sentimientos de culpa o arrepentimiento, emociones superficiales, insensibilidad o falta de empatía e incapacidad de reconocer la responsabilidad de sus actos.

2. **Componente conductual.** El psicópata se caracteriza por: la búsqueda de sensaciones, la necesidad de estimulación y tener tendencia al aburrimiento, por llevar un estilo de vida parásito, tener falta de autocontrol, problemas de conducta precoces, no tener metas realistas, ser impulsivos, irresponsables, o tener tendencia a la delincuencia juvenil y a la revocación de la libertad condicional.

¿Crees que conociendo detalladamente estos rasgos propios del comportamiento psicopático podrías identificarlos si te encontrases con uno de ellos?

En base a estas características nos preguntamos, ¿qué estructura neuronal se encconde tras el comportamiento de estos sujetos?

2. LA QUÍMICA DEL CEREBRO DEL PSICÓPATA

En este apartado buscamos asociaciones entre la actividad cerebral y la psicopatía. Según muchos autores, entre ellos A. Raine y N. Fontaine, la psicopatía está fuertemente condicionada por factores neurobiológicos[8].

El cerebro humano funciona en base a impulsos eléctricos y reacciones químicas. La estructura cerebral determina la frecuencia y repercusión de estas reacciones e impulsos, lo que condiciona el comportamiento del individuo. Muchas investigaciones avalan la idea de que la psicopatía responde a una composición cerebral concreta. Analicemos las especificidades que existen en el cerebro del psicópata:

2.1. Diferencias en el sistema límbico

El sistema límbico es una zona del cerebro responsable de responder fisiológicamente a estímulos emocionales y, por tanto, es el principal influyente en las relaciones afectivas. Hare, explica que el psicópata sufre daños en esta zona y esto provoca dificultades a la hora de inhibir o interrumpir sus conductas, aunque éstas conlleven consecuencias negativas. Esto explica el hecho de que los psicópatas *"se muestren incapaces de aprender del castigo y de pensar en el futuro, y podría ser una explicación de su irresponsabilidad, su incapacidad para establecer relaciones duraderas, el egocentrismo, la aparente inmoralidad"* [9] y su insensibilidad.

Por otro lado, en un artículo publicado por la Agencia SINC, encontramos que el neurocientífico y experto en psicopatía Kent Kiehl ha demostrado que *"diferencias en el sistema paralímbico pueden mermar el control de la impulsividad, disminuir la empatía, memoria emocional, o percepción del dolor, y afectar al aprendizaje y la toma de decisiones"*[8].

Observamos pues, que se encuentra gran parte de la sintomatología que caracteriza a los psicópatas explicada por sus lesiones o deficiencias en esta zona cerebral.

2.2. El Bajo Arousal

Por la actividad del EEG (Electroencefalograma) se ha descubierto que los psicópatas se caracterizan por tener un bajo arousal o bajo nivel de excitación cortical, lo que significa que reaccionan menos a estímulos ambientales. Quay explica que esto provoca que necesiten *"mucha estimulación para estar satisfechos, de modo que requieren un alto grado de motivación para incrementar su estimulación sensorial y compensar así su déficit y baja activación"*[9].

También es la causa de que sean muy propensos al aburrimiento, lo que provoca que no toleren la rutina ni la monotonía, y que estén siempre en busca de de excitación. Esto supone que se sientan muy atraídos por el riesgo y los desafíos

Por otro lado, según explica Doren, *"poseen un sistema nervioso hipoactivo, lo que hace que mediante esa búsqueda de estimulación sensorial intenten compensar la hipoactividad del sistema"*[10].

El bajo nivel de excitación cortical también conlleva un nivel bajo de ansiedad. Además, afirma A. Raine [11], que los psicópatas poseen una falta innata de respuesta al miedo. Esto es debido al mal funcionamiento de la amígdala, una zona cerebral responsable de las emociones.

En definitiva, resume Eysenck, esta *"baja excitación cortical provoca una alta extraversión, neuroticismo y psicoticismo"*[12].

Otra consecuencia del bajo arousal es *"una incapacidad parcial de condicionamiento"*[12], y esto hace que sean incapaces de aprender de las experiencias pasadas o de los castigos, según Cleckley. De este modo, concluye Eysenck, *"disminuyen la importancia de las consecuencias negativas de su conducta y tienden a continuar actuando hasta conseguir las metas que se proponen"*[12], lo que supone *"un pobre condicionamiento a las respuestas morales y sociales, es decir, un pobre desarrollo de la conciencia"*[12].

2.3 Anomalías en el sistema de recompensa del cerebro

Un estudio de la Universidad de Vanderbilt en EEUU, ha demostrado que estos sujetos poseen una anomalía específica en el sistema de recompensa del cerebro, que provoca que *"den importancia por encima de todo a la satisfacción de sus propios intereses o necesidades, sin importarles los efectos de sus actos sobre otras personas o los peligros que puedan conllevar dichos actos"* [3].

El sistema de recompensa, se compone del área tegmental y del núcleo accumbens, entre otras áreas. Éstas dos zonas liberan dopamina y controlan dicha liberación, respectivamente.

Buckholtz y sus colaboradores investigaron la relación entre la dopamina que genera el cerebro del psicópata y algunos rasgos típicos del trastorno, como la impulsividad, la tendencia a correr riesgos y la búsqueda insaciable del beneficio propio. Para ello utilizaron dos técnicas:

1. La tomografía por emisión de potrones (TEP), con la que puede observarse en directo la actividad neuronal y registrar su liberación de dopamina.

2. El escáner de resonancia magnética funcional (fMRI) que evalúa el funcionamiento del sistema de recompensa.

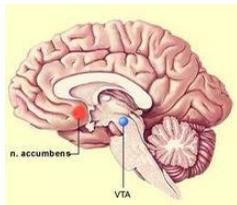


Figura 1: en rojo el núcleo accumbens [3]

Los resultados de ambas tecnologías constataron que el núcleo accumbens (localizado en el punto rojo de la fig. 1) se encontraba mucho más activo por recibir la recompensa en individuos con características psicopáticas. Esta respuesta tan exagerada de liberación de dopamina podría ser la causa de que éstos no tengan en cuenta la repercusión de sus actos. Anteponen sus objetivos a cualquier cosa, incapaces de enfocar su atención en otras que no sean la recompensa de su meta cumplida [3].

3. CONCLUSIONES

Como se ha demostrado, existen muchos condicionantes químicos en el cerebro que influyen enormemente a estos sujetos en: las respuestas que emiten al entorno, en la toma de decisiones, en los focos atencionales y en la forma en la que éstos contruyen su visión del mundo y establecen sus prioridades.

Hay corrientes de juristas que contemplan la posibilidad de catalogar a estos sujetos como posibles beneficiarios de la exención de la pena por alteración psíquica del artículo 20 del Código Penal. Esta eximente consiste en la aplicación de una medida de seguridad en sustitución de la pena al que, por su enfermedad mental, viera anuladas su capacidad volitiva y intelectual en el acto a condenar. O, en su defecto, si no eximir de la pena, rebajarla (atenuante del artículo 21 del Código Penal).

Sin embargo, no podemos olvidar que la capacidad intelectual de los psicópatas permanece intacta. Sería posible quizás fundamentar que a pesar de carecer de incapacidad intelectual, poseen tal deficiencia afectiva que no llegan a ser plenamente conscientes de la repercusión de sus acciones.

Se ha intentado en varias ocasiones a lo largo de la historia del ámbito del derecho defender la incapacidad de estos individuos de actuar de otro modo, por estar tan fuertemente condicionados a nivel neuronal. Lo cierto es que jurídicamente nunca se han dado por válidos tales argumentos.

Por otro lado, es cierto que esta enfermedad tiene un gran componente biológico, pero también suele ir ligada a una socialización temprana deficiente y a traumas infantiles. Tanto la biología como el aprendizaje juegan en el origen y desarrollo de este trastorno roles importantes.

Se plantea estudiar más su actividad cerebral mediante técnicas de neuroimagen e intentar "crear farmacológicamente un dispositivo que libere lentamente vías

químicas en las zonas dónde hay déficit de las mismas"[13]. U ofrecer, en su caso, tratamientos inhibidores de determinadas sustancias bioquímicas, según lo precise la anomalía específica. Aunque para llegar a ello todavía ha de avanzarse mucho en investigación y descubrimiento de métodos eficientes y seguros.

Kiehl [8], por su parte, no descarta que "en un futuro próximo la neurociencia nos permita predecir la psicopatía, tratarla para prevenirla, e incluso replantearnos el concepto de culpabilidad de ciertos criminales".

REFERENCIAS

- [1] V. Garrido Genovés, *Psicópata: perfil psicológico y reeducación del delincuente más peligroso*. Valencia. Tirant lo Blanch. pp. 15 y 17. 1993
- [2] F. López Reyes. "Revista CSIF", *Diagnóstico y tratamiento de la psicopatía en la adolescencia*. Nº 23, pág. 2. Octubre 2009
- [3] Y. Martínez, *Los psicópatas padecen una anomalía cerebral*. Artículo publicado en la página web: http://www.tendencias21.net/Los-psicopatas-padecen-una-anomalia-cerebral_a4233.html. Marzo 2010
- [4] V. Garrido Genovés, *Psicópata: perfil psicológico y reeducación del delincuente más peligroso*. Valencia. Tirant lo Blanch. pág. 99. 1993
- [5] L. Knight-Jadczyk. *Hervey Cleckley y los rasgos de la psicopatía*. Artículo publicado en la página web: <https://sobreviviendoapsicopatasnarcisistas.wordpress.com/2015/10/22/hervey-cleckley-y-los-rasgos-de-la-psicopatía>. Año 2015.
- [6] V. Garrido Genovés, *Psicópata: perfil psicológico y reeducación del delincuente más peligroso*. Valencia. Tirant lo Blanch. pág. 21. 1993
- [7] V. Garrido Genovés, *Psicópatas y otros delincuentes violentos*. Valencia. Tirant lo Blanch. Pág. 115. 2003
- [8] P. Estupinya, *Cerebro de psicópata*. Página web de la Agencia SINC: <http://www.agenciasinc.es/Reportajes/Cerebro-de-psicopata>. Marzo de 2011
- [9] V. Garrido Genovés, *Psicópata: perfil psicológico y reeducación del delincuente más peligroso*. Valencia. Tirant lo Blanch. pág. 29. 1993
- [10] V. Garrido Genovés, *Psicópata: perfil psicológico y reeducación del delincuente más peligroso*. Valencia. Tirant lo Blanch. pág. 31. 1993
- [11] A. Raine. Congreso de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia (AAAS), Washington DC. Personal Communication 2011.
- [12] V. Garrido Genovés, *Psicópata: perfil psicológico y reeducación del delincuente más peligroso*. Valencia. Tirant lo Blanch. pág. 27. 1993
- [13] A. Moreno. *Cerebro y Conducta*. Artículo publicado en la página web: <http://psicopatia-narcisismo.blogspot.com.es/2008/09/continuar-un-articulo-del-diario-el.html>. Año 2008

Eugenia Torres Marín, estudiante de Criminología y Derecho de la Universidad Pablo de Olavide.



Una muerte dulce

Marina Gómez de Juan

Resumen— El monóxido de carbono (CO) es un gas inodoro, incoloro, insípido y muy tóxico producido por la combustión incompleta de combustibles ricos en carbono. Hoy en día, numerosas muertes por intoxicación son producidas por la inhalación de este compuesto, tanto de forma accidental en el entorno doméstico como con fines suicidas o criminales.

Palabras Clave— Carboxihemoglobina, combustión incompleta, intoxicación, monóxido de carbono, muerte dulce.

1. INTRODUCCIÓN

EL monóxido de carbono es uno de los contaminantes químicos gaseosos más abundantes y nocivos para la salud humana, pudiendo llegar a provocar la muerte de una persona a los pocos minutos de inhalarlo. Dadas sus características físico-químicas altamente tóxicas y la carencia de propiedades organolépticas, que lo hacen prácticamente imperceptible, se ha visto relacionado con numerosos casos de muertes accidentales y violentas, mostrándose como uno de los métodos ideales para la comisión del crimen perfecto.

Este gas silencioso, descubierto por el químico francés Lassone en 1776, es producido generalmente por la combustión incompleta de combustibles derivados del carbono como la gasolina, el carbón o el petróleo. Combustibles, que eventualmente constituyen el principio funcional de la calefacción habitacional. De ahí que sea el culpable de gran parte de las muertes por intoxicación ocurridas en un entorno doméstico sometido a la hegemonía de las energías fósiles.

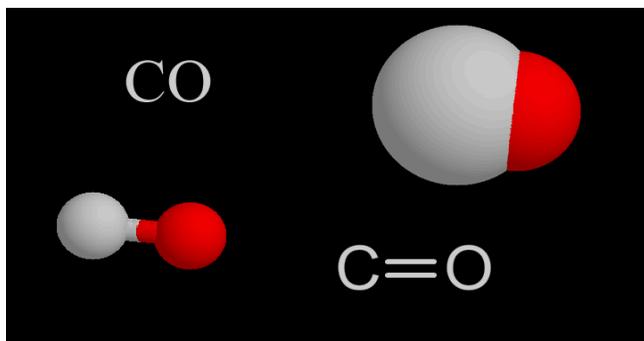


Fig 1. Geometría espacial de la molécula de CO [1].

La vía de absorción por excelencia del CO (Figura 1) es respiratoria, al atravesar la membrana alveolar hasta llegar a la sangre. La excreción se realiza también a nivel respiratorio metabolizándose previamente en el sistema hepático hacia CO₂ [2].

2. ¿CÓMO SE GENERA EL CO?

La mayoría de intoxicaciones por monóxido de carbono tienen lugar a causa de reacciones de combustión en ambientes pobres en oxígeno.

Desde el punto de vista de la Química, una combustión se considera una reacción de reducción-oxidación entre un combustible y un comburente, que desprende gran cantidad de energía en forma de luz y calor.



OXIDACION DEL CO



OXIDACION DEL H₂

Fig 2: Esquema de la reacción estequiométrica de combustión del butano (C₄H₁₀) [3].

Cuando un combustible, en este caso orgánico, y un comburente, principalmente oxígeno, reaccionan, se producen simultáneamente dos reacciones: por un lado la oxidación del H₂ en H₂O y por otro la del CO en CO₂ (Figura 2). La reacción de oxidación del hidrógeno es más rápida, por eso, si no es alcanzado el máximo grado de oxidación (normalmente por insuficiencia de oxígeno) se producirá una reacción incompleta, resultando sustancias combustibles como el CO en los gases de la combustión, que en grandes proporciones pueden ser letales [3].

3. MECANISMO DE TOXICIDAD

La toxicidad del monóxido del carbono radica fundamentalmente en la afinidad que presenta para unirse al grupo hemo de proteínas como la hemoglobina sanguínea. Dicha afinidad, se estima que es unas doscientas veces superior a la del oxígeno. Por lo que, en presencia de CO, siempre se producirá la formación de carboxihemoglobina en lugar de oxihemoglobina (Figura 3), inhibiendo el mecanismo de recaptación y transporte de oxígeno a los tejidos [4].

El enlace que une el grupo hemo con el CO es irreversible, es decir, una vez que se forma no se puede romper para formar otro enlace con otra molécula (al menos en condiciones normales de temperatura y presión). Por esto, las

personas que son expuestas a altas concentraciones de CO y luego son llevadas a un entorno gaseoso normal, no suelen experimentar mejoría inmediata, dado que los niveles de hemoglobina se encuentran demasiado saturados como para poder captar oxígeno. Además, el periodo de vida media del CO, inhalado en personas que respiran aire ambiental a 1 atmósfera de presión, oscila entre 3 y 5 horas, disminuyendo conforme se aumenta la presión parcial de oxígeno en aire inspirado [5].

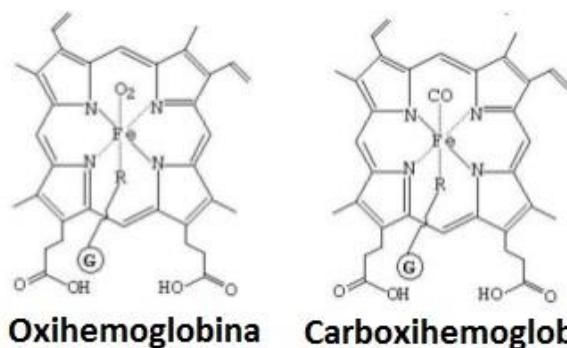


Fig 3. Estructura química de la oxihemoglobina y carboxihemoglobina [6].

Sin embargo, la toxicidad del CO no sólo se reduce a su asociación con la hemoglobina, ya que igualmente puede unirse a otras hemoproteínas como la mioglobina, la citocromo-oxidasa o el citocromo P450. De hecho, es la asociación del CO con estas dos últimas la que ha mostrado mayores efectos toxicológicos.

Así pues, a parte de bloquear la captura de O₂ mediante la unión irreversible al grupo hemo, la presencia de CO en el organismo también puede desencadenar paralelamente otros mecanismos perjudiciales. Entre estos, destacan la inhibición de la disociación del oxígeno unido a la oxihemoglobina preexistente, que evita la liberación de oxígeno a nivel tisular; la acumulación de CO en los tejidos musculares por la unión del CO con la mioglobina, lo que implica el desplazamiento de O₂ acumulado; y por último, y no menos importante, la inhibición de la actividad de la citocromo-oxidasa, que actúa en una doble vía. Por un lado, altera la capacidad de la célula para producir energía en la respiración celular, y por otro, libera moléculas muy oxidantes capaces de dañar biomoléculas esenciales tales como lípidos, proteínas, glúcidos o ácidos nucleicos [7], [8].

4. SÍNTOMAS, EFECTOS Y ETIOLOGÍA DE LAS INTOXICACIONES

En efecto, debido a la deficiencia de oxígeno, la causa de las intoxicaciones por monóxido de carbono es la hipoxia celular, razón por la cual los órganos que tienen una elevada demanda de oxígeno como el corazón y el sistema nervioso central son los que más se ven afectados.

Los efectos producidos por una intoxicación de este tipo pueden ser muy variables de unos individuos a otros, ya que hay personas que por su corta o avanzada edad, o el

diagnóstico de determinadas patologías cardíacas pueden presentar mayor sensibilidad a la presencia de CO. De cualquier modo, siempre están directamente relacionados con la concentración de carboxihemoglobina en sangre, que a su vez depende de factores tales como la concentración de monóxido de carbono en el ambiente, el tiempo de exposición, es decir, el tiempo que ha estado expuesto el individuo a unas condiciones ambientales determinadas, la absorción pulmonar e incluso la velocidad de ventilación alveolar, variable en función del ejercicio realizado durante el tiempo de exposición.

La sintomatología se puede presentar de inmediato o gradualmente en función de las condiciones de exposición, manifestando desde cefalea, mareos, dificultades respiratorias, náuseas, alteraciones del pulso cardíaco (arritmia, hipotensión, taquicardia), confusión, hasta la pérdida paulatina de la conciencia y el paro cardíaco. En ocasiones, las víctimas de las intoxicaciones entran en un estado de sopor absoluto en el que no son conscientes del verdadero peligro que les acecha, falleciendo de forma indolora, prácticamente sin experimentar sensación de angustia o asfixia. Es por ello por lo que es conocida como “muerte dulce” [9], [10].

Estos casos de “muerte dulce” suceden por lo general en el seno de los hogares, habitualmente mientras las personas duermen, quienes se van sumergiendo paulatinamente en un profundo sueño del que nunca logran despertar.

Respecto a la etiología de las intoxicaciones por CO, aunque la mayoría de las veces se producen de forma accidental, se conocen casos relacionados con móviles suicidas incluso criminales. Pues ya desde el Holocausto ocurrido en la 2^o Guerra Mundial se tenía constancia de su uso como método de exterminio en las cámaras de gas, así como de combustible sustitutivo de la gasolina cuando había escasez.

5. DOSIS TÓXICA Y LETAL

A colación de la famosa cita “Dosis sola facit venenum” (Paracelso 1491-1541), se sabe que no todas las concentraciones de CO han mostrado efectos nocivos en el organismo. Actualmente, se tiene constancia de que el cuerpo humano produce de forma natural pequeñas cantidades de este compuesto como uno de los productos del catabolismo de la hemoglobina y otros grupos hemo. De modo que es normal que en un individuo sano exista una concentración de carboxihemoglobina entre el 0.4 y 0.7%. Incluso se han registrado casos de producción endógena de CO con una saturación de carboxihemoglobina entre el 4 y el 6%, sin provocar síntomas de intoxicación aparentes (casos de fumadores, por ejemplo).

Por consiguiente, la dosis tóxica y letal es muy relativa y puede variar según las características de cada individuo (edad, patologías, estilo de vida). Aun así, se estima que la inhalación de 1600 ppm (un 0,16%) en el ambiente durante una hora, puede producir la muerte en un adulto sano [11].

6. FUENTES PRINCIPALES DE EMISIÓN DE CO

Habitualmente podemos encontrar cantidades de CO de forma natural en la atmósfera, aunque sus principales fuentes de emisión se relacionan con las actividades humanas.

Las fuentes naturales de emisión de CO serían: la oxidación del CH₄ (metano) formado por la descomposición anaerobia de la materia orgánica, erupciones volcánicas, disociación atmosférica de los intermediarios del CO₂ en la formación de “smog”, aguas oceánicas e incendios.



Fig 4: Fuentes antropogénicas de emisión de CO [12].

En contraste, las fuentes antropogénicas de emisión de CO (Figura 4) serían: la combustión incompleta de combustibles de sistemas y aparatos de calefacción domésticos (estufas, parrillas, calderas, calentadores con un funcionamiento deficitario) motores de combustión interna de los vehículos, actividades industriales (refinerías de petróleo, fábricas de papel, minas, fundiciones y técnicas metalúrgicas) que provocan reacciones de disociación del CO₂ a CO por altas temperaturas, y en menor medida el humor del tabaco y los aerosoles [13], [14].

7. CONCLUSIONES

Es una realidad que cada año aumenta el número de víctimas accidentales por intoxicaciones de monóxido, y aunque la sustitución del gas ciudad por el gas natural (metano) ha prevenido en gran medida muchas tragedias, lo cierto es que no deja ser la causa de la escasa valoración del riesgo que puede ocasionar. No obstante, la expectación y alarma social desatada en los últimos años ha generado una actitud mucho más preocupada y responsable con el uso de la calefacción doméstica.

Entre las técnicas de prevención que se han adoptado están: evitar la utilización de sistemas de calefacción de combustible vegetal, la modificación de sus propiedades químicas para que sea perceptible a través del olfato, el fomento del mantenimiento de estufas y calderas para evitar escapes, ventilación de la estancia donde se encuentre el aparato calefactor o el empleo de detectores comerciales de monóxido.

A pesar de todo, se debe valorar que, ante las posi-

bilidades de sufrir una consecuencia fatal, hay que apostar por las energías no contaminantes y avanzar hacia un futuro libre de emisiones de CO, un futuro donde la evolución en la calidad de vida no suponga el riesgo ni de la preservación del medio ambiente, ni de ninguna de las especies que en él habitan.

REFERENCIAS Y PÁGINAS DE INTERÉS

- [1] *Web de Emaze*: <https://www.emaze.com/@AIWIFWRI/Di%C3%B3xido-y-mon%C3%B3xido>. (Último acceso: 28 de enero de 2016).
- [2] *Web de Uninet*. *Intoxicación por productos industriales*: <http://tratado.uninet.edu/c100802.html>. (Último acceso: 4 de enero de 2016).
- [3] *Tema 3 Química Forense*, Grado de Criminología, Universidad Pablo de Olavide.
- [4] *Web de Fundartox*. *Intoxicación por monóxido de carbono*: <http://www.fundartox.org/nota-3-monoxido>. (Último acceso: 4 de enero de 2016).
- [5] <http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol334.htm>. (Último acceso: 4 de enero de 2016).
- [6] *Web de SlideShare*. <http://es.slideshare.net/JacquelinCarretas/carboxihemoglobina-caso-clnico>. (Último acceso: 28 de enero de 2016).
- [7] *Web de Strucplan*. <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/entrega.asp?IdEntrega=784>. (Último acceso: 28 de enero de 2016).
- [8] Bertram G Katzung; Susan B Masters; Anthony J Trevor. (2013) “*Basic and Clinical Pharmacology*”. Lange médica book. México: McGraw-Hill-Lange. pp. 987-998.
- [9] *Web del MedlinePlus*. *Intoxicación con monóxido de carbono*: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002804.htm>. (Último acceso: 28 de enero de 2016).
- [10] *Web de saludalia*. *Intoxicación por monóxido de carbono* <http://www.saludalia.com/urgencias/intoxicacion-por-monoxido-de-carbono-co>. (Último acceso: 28 de enero de 2016).
- [11] *Web de la Consejería de Salud de Murcia*: <http://www.murciasalud.es/pagina.php?id=180398&idsec=1573>. (Último acceso: 28 de enero de 2016).
- [12] <http://www.ecologiaverde.com/principales-fuentes-emision/>. (Último acceso: 4 de enero de 2016).
- [13] *Web de la Fundación Crana*: http://www.crana.org/es/contaminacion/masinformacion_3/monaxido-carbono. (Último acceso: 4 de enero de 2016).
- [14] *Libro electrónico de Ciencias de la Tierra y el Medio Ambiente. Sustancias que contaminan la atmósfera*: <http://www4.tecnun.es/asignaturas/Ecologia/Hipertexto/10CAtm1/200Conta.htm>. (Último acceso: 4 de enero de 2016).



Marina Gómez de Juan es estudiante de último curso del Grado en Criminología de la Universidad de Pablo de Olavide (Sevilla).

Ansiolíticos: la nueva forma de “acabar” con la “ansiedad”

Celia Esperanza González Ramallo

Resumen—Ansiolíticos e hipnóticos han sido durante años uno de los grupos farmacológicos más prescritos en la mayoría de los países desarrollados debido al estilo de vida acelerado imperante en los últimos tiempos. La relativa facilidad con que se obtienen dichos fármacos actualmente, está provocando una mayor tendencia a la dependencia de este tipo de medicamentos. De la ingesta prolongada de los mismos se desprenden gran cantidad de efectos negativos, sin olvidar, el peligro existente dada la posibilidad de darles uso, por sus efectos sedantes, como medio comisivo de ciertos delitos.

Palabras Claves—Ansiolíticos, Benzodiazepinas, ansiedad, sedación, parricidio.



1. INTRODUCCIÓN

En la vida hay situaciones que nos provocan estrés y nuestro cuerpo responde físicamente frente a ellas con los siguientes síntomas: el pulso del corazón se acelera, sudoración, temblor, boca seca, heces sueltas, respiración rápida, nudo en el estómago, sensación de ahogo etc. Todo el mundo reconoce estos síntomas. La ansiedad se da cuando alguno o varios de estos síntomas empiezan a aparecer en nuestra vida diariamente, sin que haya ninguna situación de estrés aparente. Muchas veces, dentro de las depresiones existen cuadros de ansiedad. Los ansiolíticos son medicamentos que utilizamos para calmar estos síntomas que se acaban de describir[1].

2. ¿QUÉ SON LOS ANSIOLÍTICOS?

Los ansiolíticos o tranquilizantes menores son un fármaco depresor del sistema nervioso central con el objetivo de disminuir o eliminar los síntomas de la ansiedad. Técnicamente el grupo más grande dentro de los ansiolíticos es el de las Benzodiazepinas. Es importante saber que las benzodiazepinas, además de utilizarse para tratar cuadros de ansiedad, se utilizan de manera generalizada en el tratamiento del insomnio[1].

Existen ansiolíticos con un efecto más sedante o hipnótico que otros y en función de esta capacidad se administran como fármacos para poder dormir o como fármacos para combatir la ansiedad. Se clasifican según la duración de su efecto en: ansiolíticos de duración larga (>24h), intermedia (10-24h) y corta (<10h). Algunos ejemplos de ansiolíticos son: Diazepam, Tranxilium, Alprazolam-Trankimazin, Lexatin. Y con efecto sedante: Noctamid-Lormetazepam, Etumina, Loracepam-Orfidal, Sedotime[2].

2.1. ¿Cómo actúan en nuestro organismo?

La función principal de los mismos es que el sistema nervioso central reduzca y ralentice sus funciones y ritmo. Hemos de saber que el sistema nervioso central se compone del encéfalo (Cerebro, Cerebelo y Tronco encefálico)

y la médula espinal y que el sistema nervioso central atiende y satisface las necesidades vitales y da respuesta a los estímulos. Ejecuta tres acciones esenciales, que son:

- La detección de estímulos
- La transmisión de informaciones
- La coordinación general

Por lo que nos podemos hacer una idea de qué nos ocurre cuando nuestro sistema nervioso se entelentece debido a un ansiolítico. La ansiedad desaparece, pero al mismo tiempo, muchas otras funciones se reducen considerablemente. Por ello, por ejemplo, no podemos conducir bajo los efectos de un ansiolítico, debido al elevado riesgo de accidente, ya que nuestras reacciones ante estímulos, cómo recibimos la información y nuestra coordinación general se encontrarían ralentizadas [2,3].

2.2. Toxicidad

Las benzodiazepinas presentan propiedades ansiolíticas, hipnóticas y sedantes. Su potencia, duración y metabolismo son variables. Las muertes debido a benzodiazepinas por vía oral son extremadamente raras, a no ser que se ingeran al tiempo con otros fármacos como barbitúricos, etanol y antidepresivos. En general el nivel de toxicidad para las benzodiazepinas es muy alto. Los efectos de la sobredosis por vía oral son leves o moderados. Se han descrito ingestiones de diazepam de 15-20 veces la dosis terapéutica sin presentarse deterioro importante de la conciencia; sin embargo, la administración intravenosa rápida, aun en dosis terapéuticas, puede inducir paro respiratorio[4].

2.3. Estructura

El término benzodiazepina se refiere a la parte de la estructura, como se observa en la Figura 1, compuesta por un anillo benceno (A) fusionado con un anillo de diazepina de siete miembros (B). Sin embargo, como todas las benzodiazepinas importantes contienen un sustitutivo 5-aril (anillo C) y un anillo 1,4-diazepina, el término se refiere ahora a las 5-aril-1,4-benzodiazepinas.

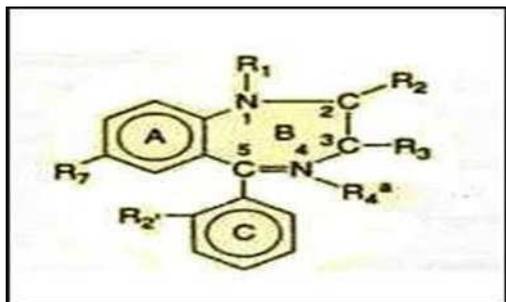


Fig.1. Estructura general de las benzodiazepinas.

Cada benzodiazepina específica surgirá por sustitución de radicales en diferentes posiciones.

La naturaleza química de los sustitutos en las posiciones 1 a 3 puede incluir anillos triazol o imidazol fusionados en las posiciones 1 y 2. La sustitución del anillo C con una función ceto en la posición 5 y un sustitutivo metilo en la 4 son aspectos estructurales importantes del antagonista de la benzodiazepina llamado flumazenil.

La denominación de estos compuestos, suele peculiarizarse por la terminación -lam o -lan (triazolam, benzepam, oxazolam, estazolam) y por la terminación -pam o -pan (diazepam, lorazepam, lormetazepam, flurazepam, flunitrazepam, clonazepam). Hay excepciones como el clorazepato dipotásico o el clordiazepóxido[5].

3. FRECUENTE USO DE ANSIOLÍTICOS EN LA ACTUALIDAD

El competitivo ritmo de vida característico de las sociedades occidentales del siglo XXI, ha propiciado el hecho de recurrir a estos medicamentos como vía de escape fácil y rápida para aplacar los síntomas derivados del estrés provocado por tal manera de vivir. Así, se van relegando a un segundo plano lo que podríamos denominar "ansiolíticos naturales" tales como la realización de ejercicio físico, llevar una vida más calmada, menos agitada, sin sobrecarga de actividades... A estas circunstancias estresantes (como podrían ser el pluriempleo precario, la cada vez mayor y necesaria formación educativa...), se encuentra sometida la mayor parte de la población debido a la situación de crisis económica a nivel europeo que venimos arrastrando. Por ello, la ingesta de ansiolíticos es cada vez mayor. Dicha conclusión puede extraerse de un estudio ecológico descriptivo del consumo de los mencionados fármacos en España (a partir de datos de medicamentos dispensados en oficinas de farmacia y facturados a través de receta oficial con cargo al Sistema Nacional de Salud).

El consumo anual y total se expresó en dicho estudio en dosis diarias definidas por 1.000 habitantes y día (DDD/1.000 hab/día) en cada subgrupo terapéutico, principio activo y atendiendo a la semivida plasmática. También se establecieron comparaciones aproximativas con otros países. Las conclusiones de dicha investigación se resumen en que durante el período estudiado (2000-

2011), el consumo de ansiolíticos e hipnóticos se incrementó en España, como muestra la Figura 2, siendo el incremento superior incluso al reportado en otros países europeos[6].

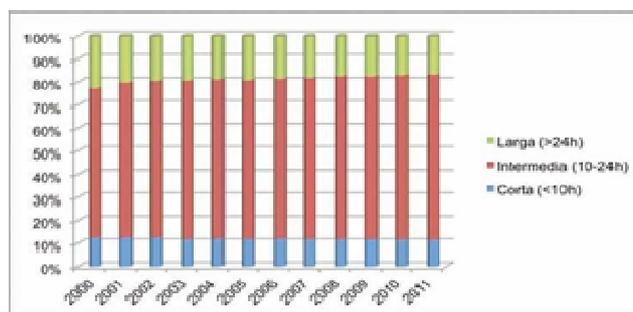


Fig. 2. Evolución del consumo de ansiolíticos e hipnóticos en España (2000-2011) según su semivida plasmática.

4. LA MODERNA FORMA DE "ACABAR" CON LO QUE TE "PROVOCA" ANSIEDAD

Recientemente hemos podido observar de forma continuada a través de los medios de comunicación, una oleada de casos de asesinato parricida, al parecer cada vez con mayor frecuencia, en los cuales, padres han acabado presuntamente con la vida de sus hijos menores por medio de la utilización de ansiolíticos como sedantes para la posterior consumación del delito. Parece ser que el móvil principal de dichos asesinatos podría ser el hecho de la pretensión de deshacerse de sus hijos al resultarles factores estresantes y molestos para sus relaciones conyugales, de ocio, venganza entre los progenitores... La presencia de estos medicamentos en cantidades excesivas en el cuerpo de un niño puede derivar en el coma y posterior muerte por sobredosis del menor (aparentemente el propósito principal por parte del agresor). En los casos en que no se consiga dicho objetivo, se utilizaría este efecto de sedación o somnolencia, tanto como para actuar con alevosía como para facilitar la consiguiente consumación del delito a través de otros métodos tales como la sofocación, incineración, etc... Creo que en estos casos, al ser la víctima hijo/a del agresor, podría entenderse que si el parricida pretende acabar con la vida de su hijo, querrá hacerlo de la manera más rápida posible y que "menos sufrimiento" le cause.

A modo ejemplificativo puede hacerse mención a los casos que han sido más mediáticos en los últimos tiempos; Casos "Asunta" (especial referencia al mismo por su inminencia) y "Bretón" o más conocido como el caso de "Los niños de Córdoba".

4.1. Caso "Asunta"

Hace pocos días, recibíamos la noticia del veredicto del jurado popular que condenaba a los padres

adoptivos de la pequeña Asunta como autores del asesinato de la menor. Según el texto que el jurado ha presentado como veredicto:

- a) EL SUMINISTRO DE LORAZEPAM. De común acuerdo, los acusados suministraron repetidamente desde al menos tres meses antes del fallecimiento a su hija Asunta un medicamento que contenía Lorazepam (produce somnolencia y sedación). El padre, retiró en al menos tres ocasiones, una cantidad de cómo mínimo, 125 comprimidos de Orfidal de la farmacia.
- b) LA ÚLTIMA COMIDA. Los acusados deciden de mutuo acuerdo acabar con la vida de su hija. Comieron en el domicilio del padre de la niña y le suministraron una cantidad tóxica de Lorazepam para posteriormente, cuando tuviese efecto, asfixiarla. Los informes revelan que la niña presentaba un alto grado de microgramos de Lorazepam (0,68 microgramos) por mililitro de sangre además de en el contenido gástrico.
- c) EL CRIMEN. Los acusados asfixiaron a su hija por medio de la compresión que le aplicaron sobre la nariz y la boca. Antes de morir fue atada por los brazos y los tobillos por medio de cuerdas de plástico cuando se encontraba bajo los efectos del medicamento, con una dosis casi mortal (según el Instituto Nacional de Toxicología), por lo que no pudo defenderse[7].

4.2. Caso “Bretón”

En este caso, el padre de los niños, como venganza hacia su mujer causó la muerte de sus dos hijos suministrándoles ansiolíticos y barbitúricos (fármacos de efectos sedantes y depresores del Sistema Nervioso Central similares a los ansiolíticos) a él recetados con anterioridad por un psiquiatra, para posteriormente, consumir su delito con la incineración de los menores.

5. CONCLUSIONES

El empleo de ansiolíticos casi se está convirtiendo en un medicamento de ingesta cotidiana entre un gran número de personas de nuestra población para tratar los síntomas del estrés y la ansiedad con efectividad y sobre todo, rapidez. Los médicos advierten de la dependencia que generan y de los efectos negativos para la salud que producen a largo plazo. Considero que es necesario tener especial precaución por parte de los especialistas a la hora de recetar este tipo de medicación a la ligera debido a sus potentes efectos sedativos, y principalmente por el posible uso desviado que puede hacerse de ellos, tal y como hemos podido comprobar con los casos ejemplificados, para fines totalmente opuestos al destino previsto de estos fármacos, fines que, solo la condición humana puede llegar a inventar.

REFERENCIAS

- [1] <http://quemedaspara.es/los-ansioliticos-tratamiento/>
- [2] <http://tratamiento-ansiedad-depresion.com/blog/tratamientos/como-funcionan-los-ansioliticos/>
- [3] <http://es.slideshare.net/yukijenn/el-encefalo-sus-partes-y-funciones>
- [4] http://www.aibarra.org/apuntes/criticos/guias/intoxicacion/in_toxicacion_por_benzodiazepinas.pdf
- [5] <http://www.monografias.com/trabajos82/benzodiazepinas/benzodiazepinas.shtml>
- [6] M.P. Vicente Sánchez, D. Macías Saint-Gerons, C. de la Fuente Honrubia, D. González Bermejo, D. Montero Corominas y F. Catalá-López. *Evolución del uso de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España durante el periodo 2000-2011*, pp.247 y 249.
- [7] <http://www.lavozdegalicia.es/galicia/2015/10/30/00161446245035325165892.htm>



Celia Esperanza González Ramallo
estudiante de Derecho y Criminología de quinto curso en la Universidad Pablo de Olavide.

¿CUÁNTA VITAMINA HAY EN MI ZUMO?

J. M. Gómez, M. Poyato, P. Ortiz

J. Luís Pérez, A. Marcos Naz, C. Clavijo

Resumen- Este artículo muestra un estudio realizado sobre diferentes tipos de zumos para deducir o calcular la cantidad de ácido ascórbico, vitamina C, que contienen. Para ello se realizan valoraciones en el laboratorio con el fin de conocer diferentes aspectos.

Palabras clave: ácido ascórbico, valoraciones, redox, zumos, bachillerato, IES

1. INTRODUCCIÓN

En este artículo se desarrolla el trabajo de investigación realizado por alumnado de 1º de bachillerato dirigidos por investigadores de la Universidad, de la facultad de Química, y tutorizados por profesores de su centro educativo. Esta investigación ha sido posible dentro del proyecto "Jóvenes con Investigadores", en el que el alumnado realiza un proyecto de investigación junto a investigadores de la Universidad o del CSIC.

La investigación es fundamental para el avance de la Ciencia, y es por eso tan importante introducirla desde el instituto para formar los investigadores del mañana. Por otro lado aprender a realizar un proyecto de investigación, es fundamental para cualquier disciplina. Estos dos objetivos se cumplen con creces con el proyecto Jóvenes con Investigadores.

Este proyecto de investigación se basa en la búsqueda de diversos objetivos, con los que se puedan cerrar una o varias conclusiones que respondan a las hipótesis iniciales. Para comenzar nos planteamos algunas preguntas: ¿qué zumo de fruta tiene mayor cantidad de vitamina C?, ¿afectan las diferentes condiciones del zumo a la cantidad de vitamina C?, ¿la información nutricional de los tetrabricks de zumo es veraz?, así como otras inquietudes que surgirán a lo largo del desarrollo del proyecto.

Para la experimentación se requieren diferentes zumos sobre los que trabajar (Imagen 1). Para el

proyecto se usaran varios tipos de zumos: de origen natural, de naranja, limón, pomelo y mandarina; y dos tipos de zumos procesados industrialmente, "néctar con azúcar" y "Fruta + Leche".



Imagen 1: Zumos de fruta

Antes de profundizar más en el tema es importante tener ciertas nociones básicas acerca del ácido ascórbico (imagen 2) y sus características. Es una vitamina hidrosoluble que se presenta en forma de polvo amarillento, esencial para todos los seres vivos.

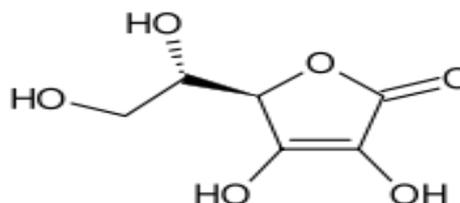


Imagen 2: Estructura orgánica del Ácido Ascórbico (Aa)

Aunque muchos son capaces de generarlo de forma natural, el ser humano necesita captarlo del exterior. Este es uno de los motivos por lo que es

importante conocer más a fondo uno de los principales métodos de ingesta: a través de los zumos de frutas. La enfermedad degenerada por la falta de esta vitamina se conoce como *escorbuto*.

Finalmente es necesario tener nociones básicas acerca del desarrollo del trabajo en el laboratorio, lo principal es realizar las disoluciones que actuarán como reactivos. Si las disoluciones no se han hecho correctamente cualquier conclusión obtenida será errónea. Para esta experimentación se usará la valoración REDOX como proceso de experimentación en el laboratorio. En este caso el reactivo principal es el yodato de potasio (KIO_3), que reacciona con el ácido ascórbico del zumo y como indicador de la reacción se usará el almidón. Este proceso se explicará en profundidad en el siguiente punto.

2. MATERIALES Y REACTIVOS EMPLEADOS

La investigación comienza con los preparativos del trabajo de laboratorio, para ello son indispensables los materiales y herramientas de seguridad: bata de laboratorio, guantes de látex y gafas de protección. También es necesario tener acceso directo a todos los materiales de laboratorio que hacen falta: matraces aforados y *Erlenmeyer*, vasos de precipitado, buretas, pipetas...

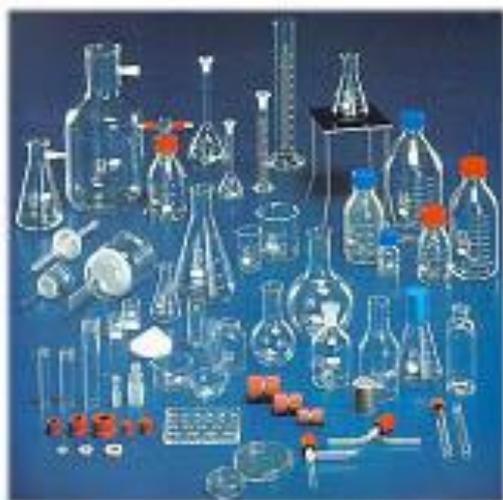


Imagen 3: Materiales de laboratorio

Teniendo en cuenta estos materiales se pasa a la parte práctica. En primer lugar se preparan las disoluciones de los reactivos: KIO_3 (0,43 g en 1 L de agua), KI (10 g en 100 mL de agua), HCl (50 mL en 200 mL de agua) y almidón. Se dispone una mezcla, igual para todos los zumos, en un matraz *Erlenmeyer*, en la que se añaden: 20 mL del zumo que se desea valorar, 5 mL de la disolución de KI, 5 mL de la de HCl y entre 12 y 15 gotas de almidón. El reactivo principal, KIO_3 , se dispone en una bureta bien enrasada para ver la cantidad que se gasta reaccionando con el ácido ascórbico.

3. VALORACIÓN REDOX DE LOS DIFERENTES ZUMOS. RESULTADOS

Se realizan las valoraciones que concluyen con el cambio de color de almidón del zumo a marrón. Con la cantidad de KIO_3 gastada en la bureta se sustituye en la siguiente fórmula que resume las conversiones necesarias para el cálculo.

$$masa\ Aa/_{20\ mL} = V\ KIO_3\ (empleado) \times [KIO_3] \times 3 \times M_{Aa}$$

Siendo M_{Aa} la masa atómica del ácido ascórbico. Con este cálculo se obtienen datos muy reveladores acerca de la investigación. Que vemos en la siguiente tabla:

FRUTA	CONDICIONES	VOLUMEN A VALORAR	VOLUMEN DE KIO_3 EMPLEADO	CANTIDAD DE VITAMINA C EN 100 mL
POMELO	Recién exprimido	20 mL	8'6 mL	45'65 mg
	1 hora después		7'7 mL	40'85 mg
NARANJA	Recién exprimido	20 mL	11'63 mL	61'75 mg
	1 hora después		11'3 mL	60 mg
MANDARINA	Recién exprimido	20 mL	7 mL	37'15 mg
	Aireado			
LIMÓN	Recién exprimido	20 mL	8'7 mL	46'15 mg
	1 hora después		8'53 mL	45'25 mg
INDUSTRIAL: NECTAR CON AZÚCAR	Recién exprimido	20 mL	8'6 mL	45'65 mg
	Aireado			
INDUSTRIAL: FRUTA + LECHE	Envasado	20 mL	3'5 mL	18'55 mg
INDUSTRIAL: FRUTA + LECHE	Envasado	20 mL	8'1 mL	43 mg

Tabla 1: Resultados obtenidos según zumos medidos

4. CONCLUSIONES

En primera instancia se responde a las hipótesis iniciales:

- El zumo de naranja contiene más vitamina C que el resto.

- Se puede apreciar, como era evidente, que cuando se valora el zumo recién exprimido tiene más vitamina C que en reposo o aireado. En el zumo de pomelo se aprecia una irregularidad cuando se airea, el aumento de concentración se puede atribuir a una reducción en la cantidad de disolvente, en este caso provocada por la evaporación del agua.

- Por último se comprueba la poca cantidad de vitamina C que posee el “néctar con azúcar” y se confirma la veracidad de la información nutricional del zumo de “Fruta + Leche”, que indica, aproximadamente, 40 mg de vitamina C por cada 100mL.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo manifestamos nuestro agradecimiento por el apoyo recibido de los centros de enseñanza IES “Itaca” de Tomares, IES “Juan Ciudad Duarte” de Bormujos e IES “Martín Rivero” de Ronda a los que pertenecen el alumnado investigador. También a nuestras familias por su inestimable implicación en el proyecto. Por último al ayuntamiento de Bormujos por facilitar el transporte a la Facultad de Química de Sevilla.

REFERENCIAS

- Memoria de la investigación *“Estudio de la cantidad de vitamina C en los zumos dependiendo de la fruta y del tiempo transcurrido”* disponible en www.jovenesconinvestigadores.wordpress.com

La vida rural: ¿enemiga del asma?

Jesús Porcuna Doncel y Gonzalo Vígara Astillero

Resumen—Parece ser que la vida rural es enemiga del asma. Se ha observado que, salvo algunas excepciones, demográficamente los niños que viven en zonas rurales tienen menos tendencia a padecer asma y otro tipo de afectaciones como las atopías. Estos datos han llamado la atención de la comunidad científica y se han hecho la pregunta de si la vida rural protege o no frente al asma. Se han planteado distintas hipótesis, todas ellas basadas en la hipótesis de la higiene, y todas ponen de manifiesto que vivir en un ambiente con mayor número de alérgenos hace que nuestro sistema inmune se regule, por diversos motivos, hacia una menor hipersensibilidad contra alérgenos frente a los que no debería reaccionar. Para alejarnos de hipótesis, se han realizado estudios científicos en ratones que parecen afirmar que realmente un ambiente rural protege frente al asma. Además, se piensa que la proteína A20 tiene un efecto protector sobre el asma y que esta se desarrolla en ambientes rurales. Además, se está hablando del importante papel del gen *tnfrsf3*, el cual puede variar en ciertos SNPs dando poliformismo que podrían explicar porque pese a vivir en un ambiente rural hay niños que aún padecen asma.

Palabras Claves—Asma, Granja, Atopía, Higiene, A20, Sistema Inmune



1. INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad crónica cuyo principal aspecto es una inflamación de los pulmones que conlleva un estrechamiento de las vías respiratorias. No es una enfermedad que se pueda considerar de alta gravedad, aunque depende del grado, pero sí que supone una traba para la realización de una vida normal y la sensación de tener un buen estado de salud. Esto se debe a que produce lo que se llaman pitidos pulmonares o ruido al respirar, dificultad respiratoria que se ve reflejada en una sensación de dureza del pecho y tos aguda [1].

Todos estos síntomas que conforman la enfermedad aparecen en la mayoría de los casos debido a una reacción del epitelio pulmonar, principalmente, contra algo que considera un alérgeno, como podría ser el polen o el propio polvo y sus ácaros. Bajo la presencia de estos alérgenos, se liberan en los pulmones, entre otros, interleuquinas proinflamatorias que provocan un estrechamiento de las vías, dolor y el resto de los signos y síntomas del asma [1][2].

El asma es una enfermedad que puede afectar a personas de todas las edades. Desde hace 30 años hasta la actualidad, la mortalidad por asma ha descendido enormemente, debido a los avances médicos. Sin embargo, es sorprendente que la morbilidad haya aumentado. La mayoría de los casos empiezan en la infancia y la demografía de la enfermedad demuestra que el porcentaje de niños afectados por asma varía mucho entre países, por ejemplo en Georgia es de un 3% hasta Nueva Zelanda, en torno al 33% [1][3].

2. VIVIR EN UN ENTORNO RURAL: ¿PROTEGE DEL ASMA?

El aumento en el número de casos de asma no parece aplicarse al conjunto de la población por igual, sino que recientemente se observan más casos de asma en zonas urbanas, y en general en los países más modernos del mundo actual. Este dato está haciendo cuestionar a los especialistas si vivir en zonas rurales donde hay una exposición a distintos agentes a los que hay en una zona urbana podría ser la razón que explicase el aumento de niños enfermos de asma en las ciudades. Hay que decir que no sólo el asma cumple esta regla, sino que también otro tipo de enfermedades llamadas atopías, como la dermatitis atópica [4].

Pese a la hipótesis de que la influencia de un ambiente rural puede proteger frente al asma y otras enfermedades, no se conoce una razón científicamente probada que demuestre que así es. Es por esto el motivo por el cual se están llevando a cabo distintos estudios sobre el tema en los últimos años [4].

Las diferencias observadas entre los niños de ciudad y los que viven en zonas rurales puede deberse a los factores ambientales a los que se exponen. El polvo, sus ácaros, pesticidas e inclusive otros alérgenos derivados del contacto con el ganado como sus propios patógenos o endotoxinas de éstos. Para demostrar si esto tiene algún efecto, se han llevado a cabo numerosos estudios poblacionales de alta envergadura como por ejemplo en Suiza con 1620 niños y adolescentes, 2283 en Australia o 7981 en Finlan-

dia. En estos estudios se demuestra en la mayoría de los casos que los niños que han crecido en granjas tienen una menor tendencia a padecer asma que los niños que han crecido en ciudades [4]. Sin embargo, no en todos los casos, debemos separar a Nueva Zelanda y Australia, que no ha demostrado que sea así (Tabla 1).

	Zonas Rurales	Zonas Urbanas
Estados Unidos	5,70%	7,10%
Etiopía	1,30%	3,60%
Suecia	4,50%	11%
Kenia	3,90%	11,20%
India	7%	12,50%
Suiza	7,80%	9,60%
Dinamarca	8%	8,40%
Canada	10,10%	10,80%
Austria	1,10%	3,90%
Alemania	3,40%	6,40%
Australia	43,40%	40,60%
Europa Occidental	5,40%	11,80%
Finlandia	5%	5,60%
Nueva Zelanda	34%	33%

Tabla 1. Tabla en la que encontramos la incidencia de asma sobre la población, en tanto por ciento, observando una mayor incidencia de asma en zonas urbanas. En Australia y Nueva Zelanda, sin embargo, se observa lo contrario.

3. LA HIPÓTESIS DE LA HIGIENE

La hipótesis de la higiene, formulada por Strachan, intenta explicar que el descenso de enfermedades infecciosas en la actualidad está relacionado con un aumento de enfermedades autoinmunes, alergias y distintos tipos de hipersensibilidades. Según esta hipótesis, la falta de exposición a distintos compuestos de un ambiente “sucio” provoca que el sistema inmune reaccione contra alérgenos que realmente no lo son; de tal modo que carece de tiempo para encargarse de enfermedades infecciosas menores [5]. Así pues, en relación con el menor número de casos de asma en niños que viven en ambientes rurales, la hipótesis de la higiene explicaría que la convivencia con ganado y en un ambiente más sucio supone una exposición continua a distintos compuestos evitando una reacción inmunológica frente a éstos, lo que frenaría la aparición del asma [4]. Para explicar esta hipótesis desde un punto de vista más inmunológico y aplicarla al caso de la prevalencia del asma existen diversas explicaciones.

La primera de ellas hace referencia a un balance entre linfocitos Th1 y los Th2. Se conoce que exposiciones a

microorganismos concretos hace que la población de linfocitos Th sea mayoritaria en Th1, por ejemplo, una exposición a endotoxinas activa el promotor de la IL-12 que provoca la maduración de células T *naive* hacia linfocitos Th1. Esta disminución en la población de los Th2 estaría relacionada con una menor producción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-3, que en niveles normales inducirían la producción de IgE. Al haber menor cantidad de IgE, se va a unir menos a los receptores de mastocitos, eosinófilos y basófilos encargados de liberar citosinas y moléculas proinflamatorias. Así pues, una menor población de Th2 conllevaría una menor inflamación, obstrucción de las vías respiratorias y la ausencia de asma [4][6].

Otra de las explicaciones se basa en la competencia antigénica para mantener la homeostasis. Se piensa desde hace varios años que las respuestas inmunes son capaces de inhibirse unas a las otras, de competir. De tal modo que una gran respuesta inmune es capaz de inhibir a aquellas originadas por antígenos débiles. Así pues, en ambientes rurales, al haber mayor exposición frente a distintos agentes patogénicos se crearían unas respuestas inmunes frente a estos que a su vez inhibirían aquellas producidas por otros compuestos como el polen o los ácaros del polvo que *per se* supondrían una respuesta inmunológica débil. Por tanto, se evita la respuesta frente a estos. Los niños que viven en zonas urbanas se exponen a un entorno sano y limpio, por lo tanto no presentarían respuestas inmunes capaces de inhibir aquellas creadas por los alérgenos que producen el asma [6].

Hay otros estudios que demuestran que si el sistema inmune se encarga de otro tipo de antígenos, como aquellos que pertenecen a bacterias infecciosas, se promueve además una protección contra enfermedades alérgicas. Este concepto está relacionado con los receptores de tipo Toll o Toll-like receptors, TLRs. Los TLRs tienen capacidad para estimular la producción de citoquinas con lo que deberíamos pensar que aumenta las respuestas alérgicas y autoinmunes. No obstante, también se ha demostrado que una activación de los TLRs puede conllevar una inhibición de la aparición de ciertas enfermedades autoinmunes y alérgicas. Esto podría ser una de las explicaciones que podrían aplicarse al caso del asma. De igual forma, existen otras explicaciones para aplicar la hipótesis de la higiene al caso del asma como los genes activados por respuestas ambientales u otros procesos de inmunorregulación, pero ninguno de ellos está demostrado con claridad [6].

4. ¿QUÉ PERMITE LA PROTECCIÓN FRENTE AL ASMA?

4.1. Acercamiento experimental

Basándose en los hechos, que demuestran que hay una menor incidencia del asma en zonas rurales, y sabiendo que la causa del asma es de origen inmunológico, lo siguiente es saber la razón por la cual la gente que vive en zonas rurales presenta una menor incidencia.

Los investigadores del laboratorio de Inmunoregulación de Belgica, en conjunto con otros centros, se propusieron encontrar qué era lo que hacía que la gente que vive en medios rurales presentara menos asma. Para ello, hicieron un estudio en el cual se utilizó como alérgeno lipopolisacárido, componente de la pared bacteriana de Gram negativas y que es una endotoxina muy abundante en el polvo de las granjas, que además se presenta en zonas no rurales, sobre todo en los suelos de las cocinas o en polvo acumulado en colchones [7].

El experimento consistió en la inyección intranasal en ratones de pequeñas cantidades de esta toxina, unos 100 ng, cada día durante dos semanas; a la vez que a otro grupo de ratones se les inyectó PBS. Posteriormente, estos ratones se expusieron a extracto de ácaros del polvo (HDM), mediante inyección intracraneal, y se observó que los ratones que habían sido expuestos previamente a la endotoxina no presentaban asma mientras que aquellos que no se expusieron desarrollaron una alta linfocitosis y eosinofilia, es decir, una gran cantidad de eosinófilos en las vías aéreas [8].

4.2. Explicación inmunológica

La pregunta es, ¿qué hacía que estos organismos no exhibieran síntomas de asma? Se sabe que la aparición de estas células se debe al reclutamiento de células dendríticas a los pulmones, que depende de una quimioquina, la CCL20, y su maduración en el factor estimulador de colonias de macrófagos (GM-CSF) [9], [10]; y posteriormente esta célula induce la polarización de los linfocitos Th2. Los linfocitos Th2 secretan, entre otros interleucina 5, la cual activa los eosinófilos e induce la reacción que desemboca en el asma [11]. Se realizaron pruebas cuantitativas que determinaron que estas dos proteínas estaban reducidas en los ratones tratados con LPS, por lo tanto se determinó que había una reducción de la respuesta inmune ante el extracto. Tras esto, y sabiendo que el principal gatillo de la reacción inmune ante HDM eran los receptores Toll de tipo 4 (TLR4) [9], los cuales desencadenan la activación de factores proinflamatorios mediante la

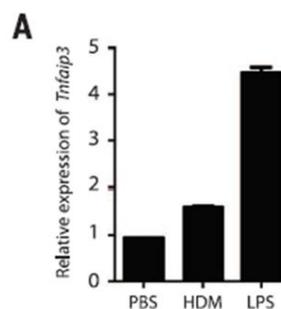


Fig 1. Grafica en la cual se muestra la expresión relativa del gen codificante de la proteína A20, *Tnfaip3*, en células del epitelio pulmonar en ratones tras la administración de los agentes de preexposición HDM (Hause dust Mite) y LPS.

liberación de la proteína NF- κ B.

Además de activar factores proinflamatorios, NF- κ B también activa la síntesis de inhibidores de proteínas como A20, una proteína ubiquitinaasa que actúa atenuando las señales de activación de NF- κ B [12]. ¿Podría ser esta proteína la responsable de la protección ante el asma? Para intentar dilucidar esto, se realizó un estudio mediante PCR cuantitativa a tiempo real del RNA, y se observó una mayor transcripción del gen *tnfaip3* en células del epitelio pulmonar (figura 2), el cual codifica la proteína A20. Este hecho establecía una prueba irrefutable del efecto protector de A20, pero para demostrarlo utilizaron ratones con el gen *tnfaip3* mutado, resultando en que estos, al realizar un tratamiento con la toxina, no exhibían protección alguna ante la inducción del asma [9].

4.3. ¿Qué hace que siga habiendo asma en medio rural a pesar de la protección?

Esta pregunta se respondió haciendo un estudio de los polimorfismos, derivados de variaciones de un nucleótido (SNP), que se encuentran en el gen *tnfaip3* en niños de 6 a 12 años. De un estudio anterior se encontró que había principalmente dos variaciones, las denominadas rs2230926 exónica y rs610604 intrónica [13]. Mientras que la segunda no tenía asociaciones a defectos en la salud, la primera sí repercutía en la salud, afectando de forma directa a la proteína A20 y llegando a causar enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso [14]. Esta mutación cambiaba una timina por una citosina, produciendo un cambio de aminoácido en la posición 12 de fenilalanina a cisteína, que repercutía directamente en la prevalencia de asma y eccemas; presentando menor predisposición a desarrollar estos síntomas aquellos niños que poseían la timinina original. [9]

5. CONCLUSIONES

El asma es una enfermedad muy abundante, y que pese a que no tiene efectos graves puede repercutir gravemente en la salud del enfermo. Demográficamente se ha visto que hay cierta tendencia en la población infantil a padecer asma en las zonas urbanas en comparación con las zonas rurales.

Este hecho no ha podido ser demostrado científicamente, y aunque hay estudios poblacionales de alta envergadura tampoco se puede concluir que realmente las zonas rurales eviten la aparición del asma. Si embargo, si que la baja aparición de la enfermedad en estas zonas ha hecho pensar a la comunidad científica en una explicación. Para dar dicha explicación se ha recurrido a la hipótesis de la higiene: vivir en un ambiente limpio hace que nuestro sistema inmune, por distintos motivos, responda contra alérgenos que no debería. Otros investigadores han hecho estudios en ratones y señalan a la proteína A20 como proteína protectora frente al asma y que aparece en situaciones donde hay suciedad. Además, se ha visto que ciertos SNPs en el gen *tnfaip3* podrían explicar que niños en ambientes rurales sigan padeciendo asma.

REFERENCIAS

- [1] Lieberman, MD Phil. Understanding asthma. *Univ. Press of Mississippi*, 1999.
- [2] Zeldin, Darryl C., et al. "How exposures to biologics influence the induction and incidence of asthma." *Environmental health perspectives* (2006): 620-626.
- [3] Becerra, Mario Humberto Vargas. "Epidemiología del asma." *Neumología y Cirugía de Tórax* 68 (2009): S2.
- [4] Naleway, Allison L. "Asthma and atopy in rural children: is farming protective?." *Clinical medicine & research* 2.1 (2004): 5-12.
- [5] Bloomfield, S. F., et al. "Too clean, or not too clean: the hygiene hypothesis and home hygiene." *Clinical & Experimental Allergy* 36.4 (2006): 402-425.
- [6] Okada, Hea, et al. "The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update." *Clinical & Experimental Immunology* 160.1 (2010): 1-9.
- [7] Braun-Fahrlander, Charlotte, et al. "Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children." *New England Journal of Medicine* 347.12 (2002): 869-877.
- [8] Schuijjs, Martijn J., et al. "Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells." *Science* 496252 (2015): 1106-1110.
- [9] Hammad, Hamida, et al. "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." *Nature medicine* 15.4 (2009): 410-416.
- [10] Plantinga, Maud, et al. "Conventional and monocyte-derived CD11b+ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen." *Immunity* 38.2 (2013): 322-335.
- [11] Di Biagio, E., et al. "Eosinophilia in Hodgkin's disease: a role for interleukin 5." *International archives of allergy and immunology* 110.3 (1996): 244-251.
- [12] Vereecke, Lars, Rudi Beyaert, and Geert van Loo. "The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology." *Trends in immunology* 30.8 (2009): 383-391.
- [13] Ege, Markus J., et al. "Gene-environment interaction for childhood asthma and exposure to farming in Central Europe." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127.1 (2011): 138-144.
- [14] Musone, Stacy L., et al. "Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus." *Nature genetics* 40.9 (2008): 1062-1064.



Gonzalo Vigarra Astillero y Jesús Porcuna Doncel

Estudiantes de 4º del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. Jesús Porcuna recibió una beca de iniciación ala investigación y Gonzalo Vigarra ya ha colaborado con distintos laboratorios. Ambos colaboran actualmente como alumnos internos en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo.

CRISPR-Cas9 y ... ¿Bebés a la carta?

Ángel Martín Bastida

Resumen— Recientemente, las científicas Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier han desarrollado un sistema capaz de reescribir el genoma con un nivel de precisión sin precedentes, y de una forma relativamente sencilla y económica. Dicho sistema, llamado CRISPR-Cas9, supone una revolución total para el ser humano. La tecnología CRISPR-Cas9 es potencialmente capaz de realizar modificaciones a la carta en el genoma de células somáticas, germinales o embrionarias. Las primeras aproximaciones de la técnica se desarrollaron con idea de evitar enfermedades genéticas. Sin embargo, la realidad es que, al menos a efectos teóricos, CRISPR-Cas9 nos permitiría ir mucho más allá. El peligro potencial frente a un posible uso inapropiado de esta potente herramienta ha obligado a la comunidad científica a reconsiderar sus implicaciones éticas y de seguridad. No obstante y a pesar de la pausa, ya es posible afirmar: la era de los humanos de diseño ha llegado.

Palabras Claves— CRISPR-Cas9, Genome-editing, Líneas germinales, ARTs, Bioética.



1. INTRODUCCIÓN

Los CRISPRs (del inglés: “*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*”) son agrupaciones de pequeñas secuencias palindrómicas de ADN que se repiten y están separadas por ADN espaciador. Se asocian a un grupo de genes (genes Cas) y a una secuencia líder para conformar un complejo sistema de inmunidad adaptativa en organismos procariotas. [1] Los productos de transcripción de dichos espaciadores guían la degradación de ADN exógeno codificante para transcritos homólogos a ellos, llevándose a cabo un proceso de silenciamiento génico a nivel de ADN. [1] [2]

Cuando se comenzó a estudiar el mecanismo, se tomó un sistema sencillo CRISPR/Cas, basado en una única proteína: la nucleasa Cas9. El sistema CRISPR-Cas9, concretamente, está inspirado en el sistema inmune adaptativo de *Streptococcus pyogenes* SF370. Cuando la célula reconoce material genético exógeno, transcribe una molécula de RNA de gran tamaño formada por las secuencias palindrómicas y los espaciadores. Dicha molécula es procesada para dar lugar a complejos efectores formados por una molécula de crRNA (productos transcripcionales de los espaciadores) y por Cas9. Estos complejos también están formados por una molécula de RNA llamada tracrRNA (“*Trans-activating crRNA*”), implicada en la maduración del crRNA. La molécula de crRNA guía a Cas9 hasta la molécula de ADN diana, llevándose a cabo la degradación. [3]

Cuando se combinaron el espaciador y el tracrRNA, se descubrió que junto con Cas9 eran capaces de encontrar el

ADN diana correcto y cortarlo. A la unión entre el espaciador y el tracrRNA se le llamó “RNA guía”. Así, introduciendo un gen exógeno acompañado de su RNA guía, se descubrió que era posible suprimir un gen endógeno o corregir una mutación determinada de forma específica, por acción de Cas9. [3] Esto es posible porque al introducir en el interior celular el RNA-guía con el gen exógeno diana, se produce una rotura específica de la doble cadena (DSB) gracias a que la Cas9 tiene dos sitios de corte, uno para cada hebra de ADN. Las DSBs son reparadas por recombinación homóloga (HDR) en presencia del DNA exógeno. Por esto, cuando se produce una recombinación del tipo HDR se puede introducir el gen exógeno de interés o corregir una mutación determinada con un alto nivel de especificidad.

A lo largo de los años, la todavía inexistente posibilidad de modificar genéticamente las células de las líneas germinales ha sido generalmente rechazada, por ir en contra de las leyes de la naturaleza, entre otros motivos. [4] Sin embargo, en algunos países existen vacíos legales que dotan de cierta maniobrabilidad al uso de nuevas herramientas de edición genómica, puesto que o bien las normas están dictadas por directrices en lugar de por leyes, o bien las leyes están referidas a técnicas de ingeniería genética convencionales y no afectan a las técnicas modernas. Reino Unido, el país con mayor impacto a nivel mundial en el ámbito de la reproducción asistida, ha aprobado recientemente un proyecto de ley que permitiría la donación mitocondrial para prevenir la aparición de enfermedades mitocondriales en la descendencia. Y esto supondría, básicamente, la modificación genética de las líneas germinales. [5]

Ante la inminente posibilidad de que CRISPR-Cas9 se convierta en una herramienta clínicamente viable para la edición de genomas en líneas germinales, será necesario sentar unos límites legales de una forma extremadamente prudente. Para la valoración de tal necesidad, a continuación se explorarán los procedimientos de modificación, los objetivos y la relación beneficio-riesgo del sistema CRISPR-Cas9 para la edición del genoma en líneas germinales.

2. EDICIÓN GENÓMICA EN LÍNEAS GERMINALES

La edición genómica se puede realizar a nivel de embrión, de ovocito o de espermatogonias (Figura 1) [6].

2.1. Embriones

Se realizaría por microinyección del complejo efector de la edición (RNA-guía, DNA exógeno y nucleasas) en el cigoto (estadio unicelular del embrión). Posteriormente, se llevaría a cabo el análisis de las modificaciones on-target y off-target mediante diagnóstico genético preimplantacional (PGD), en una biopsia de blastómera (si se va a transferir el embrión fresco) o trofoectodermo (si se va a transferir el embrión congelado). Tras comprobar que las modificaciones se hayan llevado a cabo correctamente, se procedería a la transferencia embrionaria.

2.2. Ovocitos

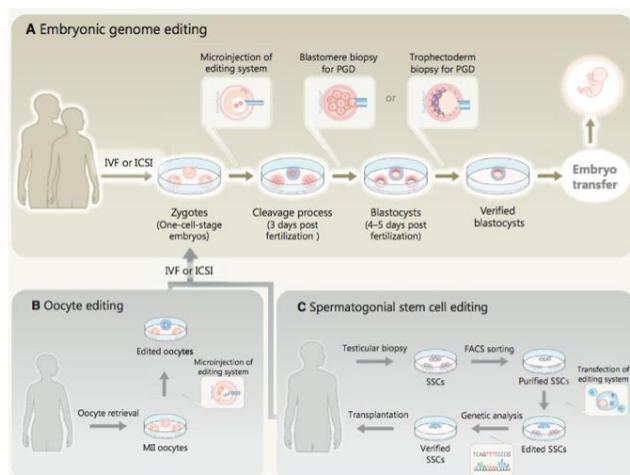


Fig. 1. Genome-editing en la línea germinal [6]

La edición genómica a nivel de ovocitos tendría lugar en el estadio de ovocito secundario, cuando éste se encuentra detenido en metafase II. El ovocito editado puede ser fertilizado por un espermatozoide mediante IVF o ICSI, y el embrión resultante sería implantado en el útero materno.

2.3. Espermatogonias

Las células madres espermatogonias se extraerían mediante una biopsia testicular, se procedería a su separación, purificación y edición con CRISPR-Cas9. Tras la verificación por PGD, se incorporarían de nuevo al hombre para que terminen de madurar in vivo. Posteriormente, se seleccionarían las células editadas para su fertilización por IVF o ICSI.

3. CONSIDERACIONES

El primer aspecto a considerar es que la modificación embrionaria podría tener efectos contraproducentes (y lo que es más importante, insospechados) en el individuo formado. Sin haberse documentado demasiado, uno podría sospechar las terribles consecuencias que tendría un corte off-target (aquellos que tienen lugar fuera de la diana) en un gen supresor de tumores, como TP53. En efecto; de ser así, el individuo desarrollará cáncer probablemente poco después del nacimiento.

En este punto cabe preguntarse.. ¿por debajo de qué porcentaje de error podríamos considerar “específica” una modificación? ¿cómo sería posible evaluar las modificaciones off-target? En cuanto a la posibilidad de modificar fenotipos controlados por más de un locus, la introducción de varios RNA-guía multiplicaría las probabilidades de ocurrencias off-target, acumulándose alteraciones por falta de especificidad.

El uso de enzimas más sofisticadas y el desarrollo de herramientas de análisis del perfil genómico de sitios off-target de alta ocurrencia, permitirán reducir la incidencia de dichos efectos. [7] Sin embargo, la vida nunca será una ciencia exacta, y por tanto la probabilidad de ocurrencia nunca será cero. En este punto, será preciso valorar si compensa asumir un riesgo, especialmente en aquellas situaciones en las que el embrión sabemos lleva escrito en su genoma el alelo que le provocará una determinada enfermedad. Todo será cuestión de probabilidades.

La corrección de pequeñas mutaciones en el embrión para revertir el genotipo silvestre en presencia de una alteración que provoca una enfermedad, se vislumbra como la primera aplicación del sistema CRISPR-Cas9. En contra de objeciones éticas, el rescate del genotipo en este tipo de casos podría considerarse como una recuperación de su estado normal. No obstante, otra corriente de pensamiento podía considerarlos como una transgresión del orden natural de los acontecimientos. En cualquiera de los casos, queda claro que por el momento las modifica-

ciones que deben estudiarse son aquellas en las que se revierta el genotipo silvestre vía HDR, utilizando un molde de ADN exógeno de pequeña longitud, con un solo tipo de RNA-guía, y con la finalidad única de corregir un fenotipo que comprometa seriamente la salud del individuo a desarrollarse.

4. OBJETIVOS

Al ámbito clínico de aplicación de CRISPR-Cas9 se le podría sumar una aplicación adicional relacionada directamente con el ámbito social: la mejora genética de los seres humanos. Además, se podría considerar su uso para la optimización y personalización de las técnicas de reproducción asistida (ART).

4.1. Mejora genética humana

Un estudio reciente ha demostrado que aproximadamente la mitad de las mujeres que buscan un donante de esperma consideran la inteligencia igual de importante que la salud, mientras que un grupo más pequeño (40,7%) da más importancia a los rasgos étnicos del individuo. Aunque se han descrito varios SNPs relacionados con la atención y la capacidad de aprendizaje del individuo, los efectos de éstos son muy pequeños. En este sentido, por ahora sería difícil aumentar la inteligencia de un individuo por edición genómica. En cuanto a los rasgos étnicos, un reciente estudio ha demostrado que en cigotos de rata el tratamiento con CRISPR-Cas9 permite rescatar a los individuos albinos por modificación de un SNP. Es de suponer que en este punto alguien se pregunte si es posible elegir tener un niño rubio de ojos azules. Pues bien, se sabe que una variante del gen OCA2 (rs1667394 A) está relacionada con el pelo rubio y los ojos azules. Sin embargo, la modificación de este gen no tendrá los efectos deseados porque el color de ojos está controlado por al menos 16 genes. [8] Por tanto, podemos afirmar que conocemos el procedimiento y la técnica, pero que aun desconocemos la correspondencia genotípica de muchos rasgos fenotípicos. Una vez sea conocida dicha relación (simplemente cuestión de tiempo), tendrán que evaluarse las posibles consecuencias de estos cambios a nivel sistémico, con el objetivo de aceptar o rechazar la viabilidad de esa modificación en concreto.

4.2. Personalización de las ART

La edición de embriones y células germinales permitiría incrementar la eficiencia de los tratamientos de reproducción asistida (ARTs), ya que en algunos casos la infertilidad está asociada con condiciones genéticas desfavorables

en los propios pacientes. Es el caso de las reorganizaciones cromosómicas, siendo la más común las translocaciones recíprocas (1 de cada 500 individuos). Este fenómeno consiste en el intercambio balanceado de material genético entre dos regiones cromosómicas terminales, y suele derivar en pérdidas recurrentes del embarazo y nacimiento de individuos con anomalías congénitas. Un paciente que no considerara la donación de gametos o la adopción, podría encontrar una solución en CRISPR-Cas9 para generar descendencia "a su imagen y semejanza". [9]

4.3. Eugenesia

Quizá sea éste sea el aspecto que suscita mayor precaución. La apertura a la modificación de la línea germinal es, simplemente, una apertura sin retorno a la eugenesia: la selección positiva de las versiones "buenas" del genoma humano y la eliminación de las "malas" versiones, no solo para la salud del individuo, sino también para el futuro de la especie. En cualquier caso, eugenesia racional seguirá siendo eugenesia, y nada podría eliminar el dolor de aquellos que nazcan en el mundo de la modificación de la línea germinal si nadie invirtió demasiado en sus gametos. A estas personas les tocará vivir con la complejidad de un genoma diferente de lo que esta tecnología será capaz de definir como "normal".

5. CONCLUSIONES

Es posible imaginar el día en el que los cromosomas humanos puedan ser modificados para asegurar que una característica u otra esté presente en un niño nacido. Este día está relativamente cerca, y nos encontramos andando a pasos de gigante. Por este motivo, los desarrolladores del sistema han solicitado la convocatoria de un grupo mundial de expertos en la tecnología de la ingeniería del genoma, el derecho y la bioética, así como de otros miembros de la comunidad científica, agencias gubernamentales y otros grupos de interés, con el fin de examinar más a fondo la seguridad de la técnica y el alcance que su aplicación debe tener por el momento.

La edición de genomas en líneas germinales permitirá prevenir enfermedades monogénicas y aumentará la eficacia de los tratamientos de reproducción asistida. La modificación genética humana deberá ser tomada con extrema cautela, y en cualquier caso, será crucial que la sociedad conozca los pros y contras de las prácticas en el posible caso de que éstas lleguen a ser aprobadas. Para esto, la comunidad científica debe analizar rigurosamente los problemas de seguridad de su empleo, estableciéndolo

se unas medidas reguladoras prudentes, y siempre anteponiendo el sentido común a la enorme diversidad de creencias culturales que nos gobiernan. Cualquier acción deberá realizarse bajo un extremo nivel de sensatez, y especialmente bajo la sola premisa de mejorar la calidad de vida de los seres humanos sin llegar en ningún caso a comprometerla.

REFERENCIAS

- [1] Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* (New York, N.Y.), 327(5962), 167–70. doi:10.1126/science.1179555
- [2] Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews. Genetics*, 11(3), 181–90. doi:10.1038/nrg2749
- [3] Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, 10(10), 957–63. doi:10.1038/nmeth.2649
- [4] Wilson, J. (2013). Embracing complexity: theory, cases and the future of bioethics. *Monash Bioethics Review*, 32(1-2), 3–21.
- [5] Araki, M., & Ishii, T. (2014). International regulatory landscape and integration of corrective genome editing into in vitro fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 12, 108. doi:10.1186/1477-7827-12-108
- [6] Ishii, T. (2015). Germ line genome editing in clinics: the approaches, objectives and global society. *Briefings in Functional Genomics*. doi:10.1093/bfgp/elv053
- [7] Lander, E. S. (2015). Brave New Genome. *The New England Journal of Medicine*, 373(1), 5–8. doi:10.1056/NEJMp1506446
- [8] Sawyer, N., Blyth, E., Kramer, W., & Frith, L. (2013). A survey of 1700 women who formed their families using donor spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, 27(4), 436–47. doi:10.1016/j.rbmo.2013.07.009
- [9] El-Toukhy, T., & Braude, P. (Eds.). (2014). *Preimplantation Genetic Diagnosis in Clinical Practice*. London: Springer London. doi:10.1007/978-1-4471-2948-6



Ángel Martín Bastida es estudiante de cuarto curso del Grado en Biotecnología, en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

El sistema inmune y el sexo

Blanca de Alarcón Gómez, Rocío Espinosa Portero

Resumen— El sistema inmunológico funciona de forma diferente en hombres y en mujeres dando lugar a un dimorfismo sexual. Esto hace que la respuesta inmune sea distinta, por lo que el ataque de patógenos, así como las enfermedades autoinmunes, no afectan de igual forma. Una posible causa de esta diferencia es que las mujeres están preparadas para el embarazo, un evento que incluye la presencia de otro organismo inmunológicamente diferente a ellas.

Palabras Claves— Embarazo, Hormonas, Respuesta inmune, Sistema inmune, Sexo

1. INTRODUCCIÓN

En vista a las muchas diferencias que hay entre hombres y mujeres a nivel biológico, no debería sorprendernos que el sexo también influya en el desarrollo de la respuesta inmune. Sin embargo, debido a la enorme complejidad del sistema inmune, aún a día de hoy, tras años de estudio, se desconocen aspectos que tienen relación con esta parte tan importante de nuestro organismo. Un ejemplo de esto es el reciente descubrimiento de la in-

fluencia de las hormonas sexuales en la respuesta inmune humana, hecho que implica un dimorfismo entre ambos sexos. Como veremos a continuación, el sistema inmune es diferente según el género, y esto además tiene una causa: el embarazo como evento inmunológico; y una consecuencia: las enfermedades autoinmunes y su distinta incidencia en hombres y mujeres.

2. EL SISTEMA INMUNE Y EL SEXO

Esta afirmación puede verse reflejada en estudios que demuestran que las mujeres producen una respuesta celular y humoral más fuerte, y por tanto son más resistentes a ciertas infecciones por patógenos que los hombres. ^[1]

El dimorfismo sexual se encuentra muy presente cuando se analizan las diferencias en los componentes del sistema inmune en ambos sexos. Mientras que el número total de linfocitos se mantiene constante en mujeres y hombres, existen diferencias en las cantidades de los dos tipos de linfocitos existentes. Los hombres, por lo general, poseen un porcentaje total de linfocitos T menor que las mujeres, que podría ser debido a las altas concentraciones de testosterona, que provoca la apoptosis de células T. Así, el número total de estas células se ve decrecido en mujeres en estado menopáusico, lo que puede ser debido a una falta de hormonas sexuales durante un largo periodo de tiempo. En cuanto a linfocitos B, no existen aún datos significativos sobre diferencias en los números entre mujeres y hombres. En cuanto a células del sistema inmune innato, se ha demostrado que el número de monocitos y células NK es superior en hombres y durante la menopausia que en mujeres, con la excepción del embarazo, donde los niveles de monocitos y granulocitos aumentan. ^{[1][2]}

No obstante, el dimorfismo entre ambos sexos es principalmente provocado por las variaciones en las hormonas sexuales (testosterona, progesterona y estrógenos), específicas para cada género e implicadas en las fases reproductivas, que conllevan la alteración de las funciones de los componentes del sistema inmune. Se ha comprobado que los estrógenos ejercen una respuesta antiinflamatoria en neutrófilos y células NK, reduciendo su número y su actividad; mientras que tienen el efecto contrario en granulocitos y macrófagos. Además, estimulan la producción de anticuerpos (y por tanto la de IgG e IgM) y aumentan la respuesta Th2. La progesterona tiene un efecto pro-inflamatorio sobre los neutrófilos. Inhibe la activación y la proliferación de linfocitos, aumentando la apoptosis de los linfocitos T y B. Por tanto, tiene efectos negativos en la producción de anticuerpos por linfocitos B así como la generación y actividad de linfocitos T citotóxicos. Por el contrario, los andrógenos (hormonas sexuales masculinas que incluyen la testosterona, androsterona y androstenediona) tienen un efecto antagonista a la pro-

gesterona, aumentando la cantidad de linfocitos T citotóxicos CD8+. Aunque no tienen efecto alguno sobre linfocitos B periféricos, reducen la población de los pre-B en la médula ósea y estimulan la respuesta Th1. ^[2]

El género y el estado reproductivo y su influencia en el sistema inmune es más claro en la respuesta inmune innata que en la adquirida. Esto se debe a que el sistema inmune no específico está implicado en varios procesos reproductivos, como la ovulación y la menstruación. Así, los ovarios son capaces de regular respuestas no específicas afectando no sólo al número de monocitos, granulocitos o células *Natural Killer* (NK) por un mecanismo aún desconocido, sino que también afectan a su función, como ya se ha descrito anteriormente. De esta manera, se concluye que es mucho más importante que los ovarios regulen la respuesta innata que la específica. ^[3]

Los efectos asociados a las diferencias a nivel de sistema inmunitario en hombres y mujeres pueden ser observados en algunas enfermedades autoinmunitarias, como el lupus eritromatoso y la artritis reumatoides. En estas enfermedades la proporción de mujeres afectadas es significativamente mayor, indicando que las hormonas pueden llegar a ser un factor clave. ^[4]

3. EL SISTEMA INMUNE Y EL EMBARAZO

Ahora bien, ¿por qué son diferentes los sistemas inmunes de hombres y mujeres? Uno de los principales motivos es con un acontecimiento que, por motivos fisiológicos, sólo es posible en las mujeres: el embarazo. Es decir, el sistema inmune de la mujer debe ser diferente al del hombre porque su cuerpo tiene que ajustarse y acomodarse a la presencia del feto, inmunológicamente diferente a ella.

Durante años se ha planteado el embarazo como un evento de alotrasplante (trasplante entre individuos de una misma especie), erróneamente. Las investigaciones han basado sobre esto las investigaciones, que estudian por qué el feto y la placenta ("semi-alotrasplante", ya que hay proteínas de ambos padres) esquivan la respuesta inmune de la madre. Sin embargo, hoy en día se sabe que la placenta no puede considerarse un órgano trasplantado, no puede ser simplificado de esta forma. La placenta es un órgano inmunológicamente único, y su presencia altera la fisiología y el sistema inmune de la madre, ade-

más de que puede ser perjudicial tanto para la madre como para el feto en el caso de infecciones o eventos patológicos.^[6]

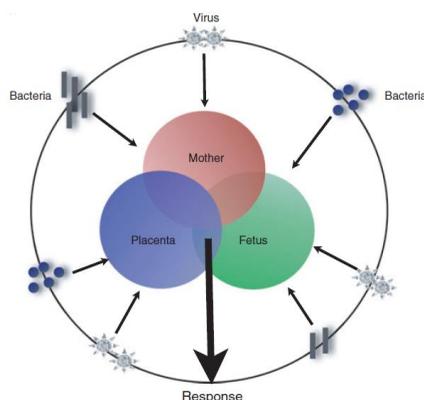


Figura 1. Respuesta inmune combinada de los tres eventos inmunológicos durante el embarazo: la madre, el feto, y la placenta.^[5]

Los sistemas inmunes de la madre, del feto y de la placenta no funcionan de forma individual, sino que han evolucionado conjuntamente para coordinarse y conseguir un embarazo que llegue a buen término. Por tanto, lo que se debería estudiar es cómo afecta o modulan el feto y la placenta el sistema inmunológico de la madre.^[5]

Además, al interpretar el embarazo como una invasión, más que como una implantación ha sido tratado como un proceso inflamatorio constante. Esto es otra simplificación al entender el embarazo como un todo cuando es un proceso compuesto, al menos, por tres eventos diferentes a nivel inmunológico, ya que las necesidades del feto van cambiando conforme éste se va desarrollando.^[5]

Por tanto, podemos hablar de tres etapas en las que el sistema inmune se comporta de forma distinta:

La primera etapa es una fase pro-inflamatoria. El embrión y el trofoblasto (precursor de la placenta) tienen que implantarse en el útero, y para ello tienen que romper e invadir el endometrio, para reemplazar ese tejido con el trofoblasto. El útero se convierte así en un “campo de batalla”, caracterizado por la inflamación. Todo esto afecta a la madre, ya que su cuerpo tiene que adaptarse a la presencia de algo nuevo, causando en parte el conocido malestar matinal.^[5] En cambio, la segunda etapa se caracteri-

za por un estado anti-inflamatorio. El feto, la madre y la placenta están totalmente coordinados para un rápido crecimiento del feto. La madre ya no sufre una invasión, sino una simbiosis.^[5] En la tercera etapa se renueva la inflamación para promover y facilitar el parto. Este ambiente inflamatorio da lugar a la contracción del útero, la expulsión del bebé y de la placenta.^[5]

En cuanto a la respuesta inmune, se sabe que las mujeres embarazadas son más resistentes, de forma generalizada, a enfermedades bacterianas y víricas, incluyendo el VIH, gracias a este estado inmunológico particular. De hecho, muchas infecciones víricas se consideran benignas en mujeres embarazadas. La placenta participa activamente en la respuesta inmune, ya que reconoce patógenos y protege contra ellos, además de funcionar como una barrera. Sin embargo, este órgano es una diana nueva, no presente en la madre de forma habitual (en el no-embarazo), para patógenos. Sin embargo, si se da la infección, las mujeres embarazadas sufren síntomas más agresivos, pudiéndose dar partos prematuros y defectos en el feto, debido a la inflamación causada por dicha infección.^{[5] [6] [7]}

5. CONCLUSIONES

La influencia de las hormonas sexuales y sus variaciones durante el estado reproductivo conlleva un dimorfismo sexual entre hombres y mujeres que se ve reflejado en el distinto número y función de los componentes del sistema inmune en ambos sexos, notable también durante el embarazo y la menopausia.

El porqué de este dimorfismo sexual puede ser explicado atendiendo a un estado único de la mujer: el embarazo. Es un proceso tanto pro- como anti-inflamatorio, que justifica que el sistema inmune de la mujer tienda a suprimirse para conservar el embrión, y que luego se adapte a la presencia del feto y se defienda de infecciones coordinándose con el feto y la placenta. Durante el embarazo se crea un estado inmunológico único, que responde de forma diferente a la presencia de microorganismos o virus. Este estado particular es facilitado por el sistema inmune de la mujer, preparado para que se dé el embarazo.

Para concluir, uno de los ejemplos más claros de este dimorfismo sexual es el mayor padecimiento de enfermedades autoinmunes en mujeres.

REFERENCIAS

- [1] Bouman, A., Heineman, M. J., & Faas, M. M. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Human reproduction update*, 11(4), 411-423.
- [2] Barañao, R. I. (2009). Hormonas sexuales y respuesta inmunológica. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*, 16, 20-30.
- [3] Ahmed, S. A., Penhale, W. J., & Talal, N. (1985). Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *The American journal of pathology*, 121(3), 531.
- [4] Cutolo, M., Sulli, A., Capellino, S., Villaggio, B., Montagna, P., Seriolo, B., & Straub, R. H. (2004). Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. *Lupus*, 13(9), 635-638.
- [5] Mor, G., & Cardenas, I. (2010). Review Article: The immune system in pregnancy: a unique complexity. *American journal of reproductive immunology*, 63(6), 425-433.
- [6] Racicot, K., Kwon, J. Y., Aldo, P., Silasi, M., & Mor, G. (2014). Un-

derstanding the complexity of the immune system during pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72(2), 107-116.

[7] Silasi, M., Cardenas, I., Kwon, J. Y., Racicot, K., Aldo, P., & Mor, G. (2015). Viral Infections During Pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, 73(3), 199-213.



Blanca de Alarcón Gómez y Rocío Espinosa Portero actualmente cursan 4º curso de Biotecnología (2015/2016) en la Universidad Pablo de Olavide (UPO), Sevilla.

El abuso de la cocaína y su efecto en el sistema inmune y citoquinas del suero

Cristina Guillén Mendoza

Resumen—La cocaína es una sustancia adictiva cuyo abuso tiene influencia en los sistemas de nuestro organismo, incluyendo al sistema inmune que se encuentra estrechamente relacionado con el sistema nervioso. Uno de los múltiples efectos del abuso de cocaína sobre el sistema inmune recae en las citoquinas del suero, tanto proinflamatorias como antiinflamatorias.

Palabras Claves—Cocaína, sistema inmune, efectos, citoquinas, sistema nervioso.

1. INTRODUCCIÓN

La cocaína, menos conocida como "(1S,3S,4R,5R)-3-hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane-4-carboxylic acid" según la IUPAC, es un agente narcótico que induce Narcosis, que es un estado más o menos profundo de adormecimiento junto con otros muchos efectos debidos al narcótico como pueden ser la euforia, estado de vigilia y energía, ansiedad y paranoia entre otros. Además tiene consecuencias negativas en el ámbito social, económico, psicológico y físico.

Como es bien conocido, la cocaína es una sustancia adictiva y por definición, todas ellas son neurológicamente activas y se conoce que tienen efecto en los sistemas

nervioso, circulatorio, respiratorio y digestivo. También se ha estudiado ampliamente la relación de la cocaína con el VIH, SIDA, cancer, problemas cardiovasculares y otras infecciones. Aunque menos conocido y estudiado, también tiene efecto en el sistema inmune que es en lo que nos centraremos en el artículo. En primer lugar comentaremos la íntima relación existente entre el sistema nervioso y el inmune, después veremos algunos de los efectos ya estudiados de la cocaína sobre el sistema inmune y por último se profundizará en el comportamiento de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias del suero en presencia de cocaína

2. RELACIÓN SISTEMA NERVIOSO-SISTEMA INMUNE

La conexión existente entre el sistema nervioso y el inmune hacen complicado el entendimiento de las acciones de la cocaína. Se trata de una relación bidireccional donde el cerebro entiende como un estrés la activación del sistema inmune a través de las citoquinas. En esta relación destacan el eje hipotálamico-pituitario-adrenal (eje HPA), el sistema nervioso simpático y el sistema inmune innato del cerebro.

El cerebro tiene sus propios componentes inmunes entre los que encontramos a los astrocitos o las células de la microglia, los cuales presentan comportamientos tanto de células neurales como inmunes. Cuando se observan estos caminos de comunicación bajo el uso crónico o la adicción a la cocaína, se percibe que estas conexiones se potencian ya que la cocaína sirve como estrés inflamatorio que hace que los leucocitos se adhieran a las células de la barrera hematoencefálica, lo que aumenta la conexión entre los dos sistemas y de hecho posibilita que los leucocitos atraviesen dicha barrera.

El eje HPA es la primera respuesta contra estrés y actúa a través de hormonas y citoquinas y puede estar involucrado en la potenciación del efecto de la cocaína. Además, las terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático conectan con los linfocitos por lo que se observa una relación entre ambos sistemas donde las citoquinas desempeñan una labor importante, no solo en el HPA sino también en la transmisión de información entre el sistema nervioso simpático y los linfocitos ya que el regreso de la información desde los linfocitos hacia las neuronas tiene lugar a través de la señalización con citoquinas.

3. EFECTOS DE LA COCAÍNA EN EL SISTEMA INMUNE

Las investigaciones acerca del efecto de la cocaína en el sistema inmune se inició en 1980 con un estudio donde se mostró que la cocaína tenía efectos supresivos en el sistema inmune y otro de los primeros artículos relacionados con el tema que data de 1983 ya describió la inmunosupresión que seguía a la administración de cocaína en ratones. A estos estudios le siguieron otros 10-15 por año desde inicios de 1990 hasta nuestros días. Lo que es extremadamente poco comparado con lo que se publicaba acerca del sistema nervioso-cocaína. Quizás debido al reducido número de publicaciones, a que la administración de la cocaína en los ensayos puede ser aguda o crónica y a que se pueden usar distintas poblaciones de células y organismos modelo, no existe acuerdo en los resultados de las investigaciones. Por lo que en este apartado se comentarán algunos efectos que se han ido demostrando

con el tiempo aunque exista controversia con sus resultados.

- Sabemos que como decía el primer artículo, la cocaína es un inmuno supresor y actúa directamente en el receptor σ_1 de las poblaciones de leucocitos, incluyendo las células T, Células B y las Natural Killer o NK. Esta supresión varía con la dosis y frecuencia de administración de la cocaína. Tras un período de administración crónica de cocaína, si se deja de administrar se observa que la inmunosupresión continúa y pueden llegar a ser alteraciones del sistema inmune permanentes.
- La cocaína tiene muchos efectos sobre el sistema inmune y una de las formas que tiene de alterarlo es elevando los niveles circulantes de glucocorticoides. En circunstancias normales, los glucocorticoides inhiben la producción de citoquinas y sus acciones biológicas, protegiendo al organismo de una respuesta inmune exacerbada.
- Cuando nos exponemos a la cocaína, la fitohemaglutinina (PHA) que induce la proliferación de los linfocitos T es reprimida y se asocia a un descenso en los niveles de Ca^{2+} citosólico y de la producción de IL-2. Sin embargo existen estudios contrarios a estos que ponen de manifiesto que una cascada más compleja de señalización está presente y se necesita más investigación.
- El abuso de cocaína es capaz de activar los componentes de la respuesta inmune innata ya que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en el cerebro esto provoca inflamación que unido a cambios en los niveles de citoquinas, estimula al eje HPA
- La secreción de citoquinas se ha demostrado que está alterada en presencia de cocaína como se observó en varios leucocitos incluyendo las células NK los linfocitos T, neutrófilos y macrófagos. Concretamente se ha visto que la cocaína provoca un incremento de las citoquinas de los linfocitos Th1 y un descenso de las de los linfocitos Th2.
- Otro estudio de 2001 sobre la proliferación de los linfocitos tras la exposición a la cocaína demostró que su supresión ocurría como resultado de las actividades periféricas de la cocaína y que la cantidad de cocaína necesaria para inducir in vitro una disminución de la función del sistema inmune era excesivamente alta por lo que tenían que estar actuando neurotensmisoros y/o el sistema neuroendocrino de manera que potencien los efectos de la cocaína sin necesidad de dosis tan elevadas.

- Debido al pequeño tamaño de la cocaína, no puede presentarse como antígeno y desencadenar la respuesta inmune pero al unirse a una proteína sí. En 2002, el estudio de Deng SX & Co demostró que algunos metabolitos de la cocaína tenían la capacidad de unirse covalentemente a proteínas endógenas del plasma como la albumina. A pesar de existir en el propio organismo estas proteínas, al ser modificadas, eran reconocidas como antígenos extraños. Si es reconocida como un antígeno extraño, en el proceso estará implicado el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC clase II) que forma un complejo con los péptidos digeridos de la proteína y activa a los linfocitos T CD4+ y después estimula a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos contra estas proteínas modificadas por la cocaína. La activación de los linfocitos T incrementa la producción de IL-2 y la sobre-regulación de la expresión del receptor de IL-2. Las células T CD4+ se diferenciarán en Th1 por IL-2 y en Th2 por IL-4 y estos últimos activarán mediante citoquinas a los linfocitos B que producirán más anticuerpos.
- En el proceso de reconocimiento del antígeno extraño, los macrófagos se activan gracias a quimioquinas inflamatorias y secretan más citoquinas que reclutan a más linfocitos. Destaca la producción de IL-6, IL-8, IL-12 que tienen un papel central en la activación de los linfocitos, la estimulación de la producción de anticuerpos y el reclutamiento de linfocitos T, respectivamente. Por lo que la modificación de las proteínas llevada a cabo por la cocaína acaba teniendo efecto tanto en la respuesta innata como adaptativa.

En las investigaciones comentadas y otras sobre los efectos de la cocaína en la función del sistema inmune se han llevado a cabo usando muestras de sangre de organismos modelo animales y líneas celulares inmunológicas. El estado inmune en el que se encuentre se evalúa midiendo la cantidad de células totales, la proliferación de linfocitos, la cantidad de anticuerpos presentes, la producción de citoquinas, etc. usando como control para comparar los resultados, los datos de pacientes no adictos a la cocaína o animales a los que no se les había suministrado cocaína. En la actualidad, los inmunoensayos más utilizados son el ELISA y la inmunohistoquímica unidas a un citómetro.

4. COCAÍNA Y CITOQUINAS PRO Y ANTIINFLAMATORIAS DEL SUERO

Las citoquinas son un conjunto de proteínas que regulan interacciones de las células del sistema inmune y su función inmunorreguladora es esencial en la respuesta inmune, inflamación y hematopoyesis. Existen distintos tipos de citoquinas entre los que destacamos a las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias presentes en el suero.

Para que la defensa se inicie de manera eficaz, se necesita la participación de citoquinas proinflamatorias y esta respuesta proinflamatoria inicial debe estar controlada por moléculas antiinflamatorias para limitar el efecto potencialmente dañino de la reacción inflamatoria. En condiciones patológicas la respuesta antiinflamatoria puede ser insuficiente para contrarrestar la inflamatoria y en algunos casos ser excesiva e inhibir al sistema inmune lo que para el paciente no es bueno ya que lo dejaría a merced de la infección.

El abuso de cocaína puede alterar el balance entre ambos tipos de citoquinas y para describir las perturbaciones nos centraremos en la citoquina proinflamatoria secundaria IL-6 que es producida por diversos tipos celulares y posee múltiples funciones biológicas entre la que destaca que es la principal citoquina proinflamatoria activada en el proceso inmune innato que resulta en la activación de la microglía y en la antiinflamatoria IL-10 cuya principal función es limitar y detener la reacción inflamatoria inhibiendo la síntesis de citoquinas.

La cocaína provoca un incremento en las citoquinas proinflamatorias y un descenso en las antiinflamatorias como se deduce de un artículo reciente donde se han medido las cantidades de IL-6 e IL-10 del suero de voluntarios jóvenes usando un kit de ELISA. Se vio que los niveles de IL-6 eran mayores en los consumidores de cocaína y los de IL-10 menores que los del grupo control. Además, para evaluar el balance de las respuestas Th1/Th2, se calculó el ratio IL-6/IL-10 y se vio que era superior en los consumidores de cocaína.

El abuso de psicoestimulantes está asociado a una respuesta inmune innata exagerada en el sistema nervioso central y al incremento de citoquinas proinflamatorias, incluida IL-6 en algunas regiones del cerebro y órganos periféricos. Las citoquinas circulantes podrían atravesar la barrera hematoencefálica y los cambios centrales se acabarían reflejando en la circulación periférica. Esta alteración en la homeostasis del sistema nervioso central provoca un daño neuronal. La reducción de los niveles de IL-10 estimula el proceso de inflamación local y el daño celular. El sistema inmune de las personas adictas a la cocaína

se ve comprometido.

5. CONCLUSIONES

Queda demostrado que la cocaína afecta al sistema inmune exacerbando la respuesta innata debido a un incremento de citoquinas proinflamatorias y comprometiendo a la función eficaz del sistema inmune debido al descenso de citoquinas inflamatorias. Sin embargo, desacuerdos entre los resultados obtenidos en numerosos artículos indican la complejidad de la relación entre la cocaína y el sistema inmune, también conectado con el sistema nervioso. Se requiere por tanto investigar más y en más profundidad los efectos de esta sustancia tanto en el sistema inmune celular como humoral usando diferentes organismos modelo incluyendo al ser humano bajo unas condiciones experimentales controladas y ajustables. También es importante mejorar las técnicas que se usan en las investigaciones puesto que tienen fallos en el ámbito biológico. Con todo ello se podrán conseguir avances contra la adicción a la cocaína desde el punto de vista del sistema inmune, que ha sido prácticamente ignorado durante todos estos años a pesar de que las proteínas del suero se modifican desde el momento en que la cocaína pasa al torrente sanguíneo y desde el punto de vista de la conexión entre sistema nervioso e inmune que puede dar lugar a nuevas terapias que reduzcan los efectos del abuso.

De los artículos utilizados sobre este tema se desprenden más preguntas que respuestas, lo que refleja el estado actual de entendimiento sobre el mismo.

REFERENCIAS

- [1] Web del NCBI de química: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
- [2] Web de la Real Academia Española. <http://www.rae.es>
- [3] Christina C. Marasco, Cody R. Goodwin, Danny Winder, Nicole Schramm-Sapyta, John A McLean and John P. Wikswo, "System-Level View of Cocaine Addiction: The Interconnection of the immune and Nervous System", *Exp Biol Med* (Maywood) 239(11) (1433-1442), 2014 November.
- [4] Monica Alejandra Costas, "Mecanismos moleculares de regulación de la sensibilidad a glucocorticoids por las citoquinas", Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1996. (Tesis doctoral)

- [5] Watson ES, Murphy JC, Elsohly HN, Elsohly MA, Turner CE, "Effects of the administration of coca alkaloids on the primary immune-responses of mice-Interaction with delta-9-tetrahydrocannabinol and ethanol", *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983; 71(1):1-13.
- [6] Pellegrino TC, Dunn KL, Bayer BM, "Mechanisms of cocaine-induced decreases in immune cell function", *Int Immunopharmacol.* 2001; 1(4) (665-75).
- [7] Deng SX, Bharat N, Fischman MC, Landry DW, "Covalent modification of proteins by cocaine", *Proc Natl Acad Sci USA* 99(6) (3412-6), 2002 Mar.
- [8] Albert H. Avila, Norma C. Alonzo, Barbara M. Bayer, Chapter "Effects of cocaine and morphine withdrawal on the immune response". Friedman, H.; Klein, TW.; Bendinelli, M., editors. *Infectious Diseases and Substance Abuse.* Springer US; 2005. p. 1-11.
- [9] Web de Medicina molecular: <http://www.Medmol.es>
- [10] R. de Pablo Sánchez, J. Montserrat Sanz, A.Prieto Martín, E. Reyes Martín, M.Alvarez de Mon Soto, M. Sánchez García, "The balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in septic states", *Med Intensiva Vol 29 Núm 3* (151-158), Abril 2005, Abstract.
- [11] José Manuel Frago-Lona, Julián Ramírez-Bello, David Cruz-Robles, Oscar Pérez-Méndez, Aurora de la Peña y Gilberto Vargas-Alarcón, "Marcadores pro y antiinflamatorios en la enfermedad arterial coronaria y el síndrome isquémico coronario agudo", *Arch Cardiol Mex* 79 (1) (54-62), 2009.
- [12] Fernanda Pedrotti Moreira, Joao Ricardo Carvalho Madeiros, Alfredo Cardoso Lhullier, Luciano Dias de Mattos Souza, Kren Jansen, Luis Valmor Portela, Diogo R.Lara, Ricardo Azevedo da Silva, Carolina David Wiener, Jean Pierre Oses, "Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10", *Drug and Alcohol Dependence* 158 (2016) 181-185, Nov 2015.



Cristina Guillén Mendoza estudiante de cuarto curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide

Inmunizando contra los prejuicios anti-vacunas

Ignacio de Loyola Ruiz Alpresa, Francisco José Molina Ruiz

Resumen—En estos últimos años, se ha criticado constantemente la seguridad (y la eficacia, los más osados) de las vacunas en general, aunque más concretamente las TCVs y la MMR, adjudicándoles un papel protagonista en la etiología de desórdenes como el autismo. En este artículo veremos qué veracidad tienen estas afirmaciones, de dónde proceden y qué lugar les resta en el mundo de la ciencia, de la evidencia, de la razón.

Palabras Claves— Vacuna MMR, tiomersal, TCVs, ASD



1. TIPOS DE VACUNAS

1.1. El tiomersal y las vacunas

A tendiendo a su contenido en tiomersal, podemos distinguir tres grupos de vacunas: las que no contienen este conservante porque están elaboradas con microbios vivos, por lo que su eficacia podría verse comprometida (como la vacuna MMR); las que contienen cantidades ínfimas (menores a 0,5 microgramos por dosis) de tiomersal ya que este solo se añade durante la producción; y por último, aquellas como la DTP (contra la difteria, tétanos y tos ferina) en las que se añade tiomersal también al producto final para evitar la contaminación en viales multidosis, y que contienen entre 10 y 50 microgramos de este conservante por dosis. (1).

Pero, ¿qué es el tiomersal? También conocido como timerosal, más parecido a su nombre en inglés, o también mercuriotiolato o 2-(etilmercuriotio) benzoato de sodio, este compuesto químico que contiene mercurio (y quizás por ello genere la polémica que se tratará más adelante) lleva utilizándose desde los años 30 en la fabricación de algunas vacunas como adyuvante. La razón no es otra que la de impedir la proliferación de bacterias y hongos durante el almacenamiento y, sobre todo, durante el uso de viales abiertos de vacunas multidosis. También sirve para inactivar ciertos microorganismos y toxinas y así mantener la esterilidad en la cadena de producción, demostrando una mayor eficacia que otros conservantes como el 2-fenoxietanol (1).

1.2. Vacuna MMR y TCVs, conociendo a las presuntas culpables

Hoy en día, para nadie es ajena la gran polémica en torno a la vacunación. En este tema se ahondará más adelante, pero antes es necesario hacer una brevísima introducción a los dos tipos de vacunas más señaladas por los detractores de las mismas: la MMR y las TCV.

La vacuna MMR (del inglés “Measles, Mumps and Rubella”) es más conocida como la “triple viral” y consiste en una mezcla de tres componentes virales atenuados, administrados por una inyección para la inmunización contra el sarampión, la parotiditis o paperas y la rubéola. Introducida en los años 70 y administrada en dos dosis (al año y 4-5 años de edad), desde su aparición ha provocado que el sarampión en particular haya pasado de ser inevitable a estar por debajo del 1% de incidencia en países que hacen uso de esta vacuna.

En cuanto a las vacunas que contienen tiomersal, la polémica surge a partir de un informe de la FDA (*Food and Drug Agency*) sobre el metil-mercurio y su toxicidad en el que se anuncia la retirada de varias sustancias que nada tenían que ver con el tiomersal o las vacunas. Sin embargo, la similitud química del metil-mercurio con el etil-mercurio produjo que parte de la comunidad médica, sin evidencia ninguna, solicitase la retirada de las TCV.

2. EL CASO WAKEFIELD, EL GRAN FRAUDE

Una de las críticas más prejuiciosas contra las vacunas es la que se ocupa de conectar la exposición a vacunas que contienen tiomersal (TCVs) y/o a la vacuna MMR (la del sarampión, parotiditis y rubéola) con el autismo o ASD (autism spectrum disorders), tal y como sugieren algunos estudios anecdóticos. Toda la controversia que gira alrededor de la administración de vacunas surgió en 1988 con la aparición de un artículo fraudulento en la revista médica “*The Lancet*”, el cual estableció las bases para que parte de los medios afirmase, de forma pretenciosa ante la falta de credibilidad, que existía una relación entre aparición de colitis y autismo con la triple vacuna MMR,

lo cual quedaría más tarde desacreditado. El autor del artículo original, el médico británico Andrew Wakefield, al encontrarse con múltiples conflictos de intereses financieros que no habían visto la luz, fue encontrado en 2010 culpable de manipulación de evidencia científica y ruptura de otros códigos éticos, como abuso de niños autistas sometidos a varios procedimientos invasivos innecesarios. No en vano, tras cargar en contra de la vacuna MMR y desacreditarla falsamente, Wakefield anunció su interés en desarrollar una vacuna alternativa que sustituyese a la MMR, con el consiguiente beneficio económico desorbitado que ello le hubiese reportado. La propia revista "The Lancet", al conocerse el veredicto, declaró el artículo como completamente falso y se retractó, afirmando que habían sido engañados. En cuanto al autor del artículo, fue eliminado del registro médico y como consecuencia se le inhabilitó para ejercer en Reino Unido.

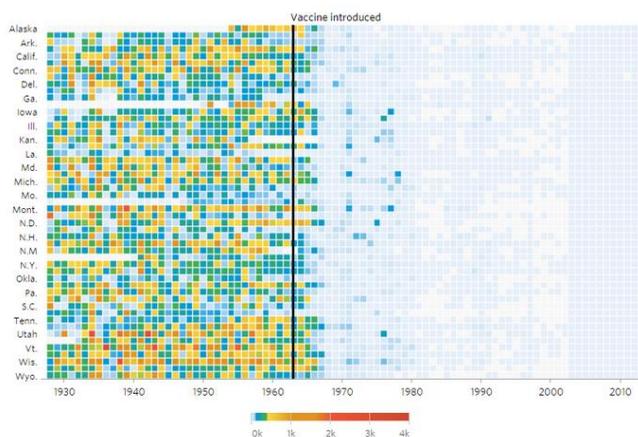


Fig. 1. Gráfico que muestra, en el eje vertical, un total de 26 estados distintos de los EE.UU. En el eje horizontal, se muestra el paso de los años desde 1930 hasta 2010. La línea negra marca el comienzo de la aplicación de la vacuna MMR. Cada cuadrado representa casos de sarampión por cada 100000 habitantes, representando el rojo unos 4000 y el azul claro 0. Como se puede observar, tras la aparición de la MMR hay un descenso muy brusco de los casos, hasta quedar la enfermedad prácticamente erradicada.

Como era de esperar, tras la controversia que surgió se llevaron a cabo exhaustivos análisis, controles y estudios epidemiológicos que, como era de esperar, desvirtuaron por completo la afirmación de Wakefield. El consenso científico actualmente, de hecho, establece que no hay motivo alguno para relacionar el desarrollo de autismo con la vacuna MMR, y que los beneficios de esta vacuna como herramienta de control de epidemias sobrepasan enormemente sus riesgos potenciales. Sin embargo, el daño ya estaba hecho: para parte de la opinión pública, las vacunas quedarían para siempre en entredicho. Desgraciadamente, siguiendo la publicación del artículo de Wakefield, la pérdida de confianza en las vacunas ocasionó

que muchos padres optasen por no vacunar a sus hijos, provocando un descenso en las tasas de vacunación de MMR en Reino Unido, Irlanda y Estados Unidos, lo que resultó en un incremento significativo de sarampión y paperas. Estos brotes, resultado final de la considerada "farsa médica más dañina de los últimos 100 años", tuvieron como consecuencia tanto heridas graves y permanentes como muertes (2). Pero el legado del Caso Wakefield se alarga incluso a la actualidad, ya que la polémica en torno a las vacunas aún es un tema candente. Las continuas advertencias de Wakefield en contra de la vacunación han contribuido a un clima de desconfianza hacia todas las vacunas (ya no solo a la MMR) y a la reaparición de otras enfermedades que se creían controladas.

3. DESMONTANDO LA FARSA

Como se ha dicho, hay una gran cantidad de estudios llevados a cabo con el correspondiente rigor científico que han conseguido desvirtuar la relación entre autismo y vacunación. En este artículo, se tratará algunos de ellos en particular, el primero proveniente del JAMA (Journal of the American Medical Association). Este estudio demuestra que no existe asociación entre ASD y MMR incluso entre niños con alto riesgo de padecer autismo. El estudio se desarrolló así: los investigadores estudiaron la conexión entre ASD y MMR en niños con hermanos mayores con y sin ASD, teniendo en cuenta las dosis de vacuna MMR a la que habían sido expuestos. De esta forma, se pretendía llegar a la conclusión, obteniendo unos resultados estadísticamente significativos, de la realidad de la relación entre ASD y MMR. Lo que se encontró fue lo siguiente: ni hay asociación entre la vacunación con MMR y el incremento del riesgo de padecer ASD, ni entre el número de dosis recibidas (una o dos) de la vacuna y el riesgo de padecer ASD entre los niños con hermanos mayores con ASD (3,4).

Por otro lado, otro estudio de gran interés utilizó a primates para llegar a conclusiones similares a las recién expuestas: que no es sostenible la hipótesis de que la vacuna por medio de MMR juega un papel importante en la etiología (causas) del autismo. Además, en esta publicación se quiso testar si existía una relación con el ASD no solo con la vacuna MMR, sino también con vacunas TCVs. Para ello, se les inculó a primates no humanos de corta edad vacunas similares a las que se les dan a nuestros niños, separándolos en 6 grupos de vacunación en los que se administró lo siguiente: solución salina (control), vacunas del plan de 1990 en EEUU para humanos, vacunas del plan de 1990 en EEUU adaptado a la vida más

corta (y desarrollo más rápido) de los primates respecto a los humanos, vacunas del plan de 2008 de EEUU, vacuna MMR, TCVs y MMR/TCVs a la vez. De esta forma, se quería comprobar si los animales exhibirían cambios comportamentales y/o neuropatológicos idiosincráticos del autismo con respecto a los animales del grupo control. Los resultados fueron negativos para los cambios comportamentales (5). Lo mismo sucedió en cuanto a los cambios neuropatológicos relacionados con el cerebelo, el hipocampo o la amígdala. Los cambios comportamentales podemos observarlos en la Figura 2.

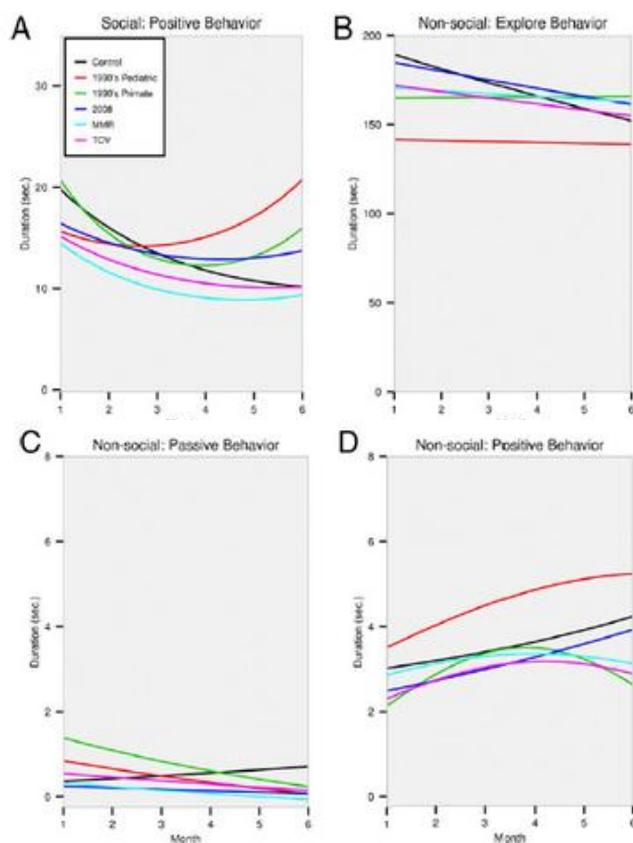


Fig. 2. podemos observar líneas de diferentes colores donde se diferencian primates de diferentes edades (12 a 18), de cada uno de los grupos de vacunación mencionados y que aparecen en la leyenda, así como 4 comportamientos diferentes: uno de ellos social (positivo, A) y tres de ellos no sociales (explorativo, B, pasivo, C y positivo, D). Como se puede observar, no hay diferencias significativas en el comportamiento entre el control y los grupos experimentales de diferente edad y tratamiento, entre los que consta la MMR y vacunas TCV (5).

3. EFECTOS SECUNDARIOS REALES DE LAS VACUNAS: NO HAY QUE ALARMARSE

Durante todo el artículo se ha insistido en la falta de evidencia científica para establecer una relación entre desarrollo de ASD y vacunación; sin embargo, esto no quiere decir que las vacunas no tengan sus riesgos. Una

vacuna, como cualquier medicamento, tiene efectos secundarios capaces de producir problemas serios como reacciones alérgicas severas.

3.1. Vacuna Triple Viral MMR

En el caso de la vacuna triple viral MMR, estos efectos pueden ser suaves (fiebres en 1 de cada 6 personas, erupciones en 1 de cada 20, hinchazón de glándulas en el cuello en 1 de cada 75...), moderados (bajo nivel de plaquetas que resulta en desórdenes de sangrado en 1 de cada 30000 personas, dolor en las articulaciones en 1 de cada 4, convulsiones en uno de cada 3000...) y severos. Aunque los efectos suaves y moderados ya de por sí son poco frecuentes, los efectos secundarios severos asociados a la vacuna MMR son extremadamente raros. Por ejemplo, la reacción alérgica severa a esta vacuna aparece en 1 de cada millón de personas vacunadas mientras que otros efectos han aparecido con tan poca frecuencia tras administrar la vacuna que se desconoce si hay relación entre estos hechos: sordera, coma, pérdida de conciencia, convulsiones a largo plazo, daño cerebral permanente...(6).

3.2. Vacunas TCVs: DTP

En el caso de efectos secundarios producidos por las vacunas que contienen tiomersal (TCVs), se puede poner como ejemplo a la vacuna DTP (contra difteria, tétanos y tos ferina). En este caso, los efectos suaves son bastante comunes (1 persona de cada 4 de media a partir de la cuarta dosis), incluyendo fiebre, enrojecimiento (y a veces hinchazón y sensibilidad) de la zona en la que se vacuna, falta de apetito, cansancio... Los efectos moderados son ya menos comunes, incluyendo fiebre alta, convulsiones y llanto descontrolado y continuo por 3 horas o más. Al igual que en el caso de la vacuna MMR, los efectos severos son muy poco frecuentes, y son los mismos o similares a los que se han mencionado para esta (6).

4. CONCLUSIONES

La conclusión lógica a la que se pretende llegar es que, aunque existen ciertos riesgos asociados a la vacunación con MMR y TCVs especialmente, la probabilidad de esta de causar daños graves o la muerte es mínima, y en todos los casos será preferible asumir el riesgo (tanto a nivel individual como a nivel colectivo de salud pública para evitar brotes de epidemias) que sufrir enfermedades como las paperas, el sarampión, el tétanos, la tos ferina... En cualquier caso, está demostrado científicamente que la aparición de ASD en niños no tiene ninguna relación con la vacunación de estos: Por último, sería recomendable reflexionar acerca del poco rigor de los medios de comunicación al difundir información fundada en artículos de

nula credibilidad promoviendo la desinformación, así como el poco criterio de parte de la opinión pública al asumir como cierto un hecho, como la falsa relación ASD-vacunas, sin requerir para ello ningún tipo de evidencia científica.

REFERENCIAS

- [1] "El Tiomersal y la Salud: Preguntas y Respuestas." Página web oficial de la Organización Mundial de la Salud
- [2] DeNoon, Daniel J (6 January 2011). "Autism/MMR Vaccine Study Faked: FAQ". WebMD Health News. Retrieved 27 December 2013.
- [3] Jain A, Marshall J, Buikema A, Bancroft T, Kelly JP, Newschaffer CJ. Autism Occurrence by MMR Vaccine Status Among US Children With Older Siblings With and Without Autism. JAMA. 2015;313(15):1534-1540. doi:10.1001/jama.2015.3077
- [4] King BH. Promising Forecast for Autism Spectrum Disorders. JAMA. 2015;313(15):1518-1519. doi:10.1001/jama.2015.2628.
- [5] Gadad, B. S., Li, W., Yazdani, U., Grady, S., Johnson, T., Hammond, J., German, D. C. (2015). Administration of thimerosal-containing vaccines to infant rhesus macaques does not result in autism-like behavior or neuropathology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(40), 12498-12503.
<http://doi.org/10.1073/pnas.1500968112>
- [6] "CDC's Vaccine Information Statements". Extraído de las recomendaciones del ACIP (*Advisory Committee for Immunization Practices*) para cada vacuna y publicado en la página web de la CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*).



Francisco José Molina Ruiz e Ignacio de Loyola Ruiz Alpresa son estudiantes de cuarto curso del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. Ambos han publicado artículos en ocasiones anteriores en la revista moleQla. En esta ocasión, aunque Francisco se encuentra más orientado hacia la rama de la Genética e Ignacio hacia la Neurociencia, escriben sobre Ciencia y Sociedad, sobre cómo los prejuicios y la ignorancia tergiversan y perjudican a la Ciencia; en definitiva,

sobre temas transversales, más allá de sus futuros campos de estudio.

Biosíntesis de Quantum Dots

Rafael Hoyos Manchado

Resumen—Los Quantum Dots son nanopartículas con propiedades ópticas muy singulares, por lo que se usan en multitud de aplicaciones biomédicas o biológicas. Uno de los tipos más importantes son los calcogenuros, especialmente los de cadmio. Aunque existen otros métodos de síntesis, se ha estudiado la posibilidad de producir estas nanopartículas de forma biológica aprovechando los mecanismos de detoxificación de metales pesados que muchos organismos poseen de forma natural. La levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe* fue el modelo pionero con este propósito pero, a lo largo de los años, se han logrado sintetizar estas nanopartículas en diversos microorganismos.

Palabras Claves— biosíntesis, quantum dots, calcogenuros, nanopartículas, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida galbrata*.



1. INTRODUCCIÓN. QUANTUM DOTS

Los Quantum Dots (QDs) han sido una de las primeras nanopartículas con aplicaciones biológicas y biomédicas. Sus interesantes propiedades ópticas hacen que sean excelentes biomarcadores y que, casi medio siglo después de su primera descripción, se encuentren en la vanguardia tecnológica [1]. Los QDs son cristales de unos cuantos nanómetros de diámetro que, en comparación con los biomarcadores fluorescentes convencionales y a diferencia de su estado macroscópico, presentan un alto rendimiento cuántico (PhotoLuminiscence Quantum Yield, PLQY), amplio rango de absorción pero estrecho en la emisión y una gran fotoestabilidad [2]. Dependiendo del tamaño de las partículas, forma y estructura, las propiedades ópticas pueden ajustarse fácilmente según la aplicación en la que vayan a usarse. Esta versatilidad, junto a las propiedades previamente descritas, hacen que los QDs sean especialmente útiles en microscopía de fluorescencia múltiple (multiplexing).

Básicamente existen dos grandes tipos de QDs. Los II-VI (sales formadas por un átomo del grupo 12, o IIB, de la tabla periódica y otro del 16, o VIA), y los III-V (un átomo del grupo 13, o IIIA, y otro del 15, o VA). El primer tipo es posiblemente el que tiene mayores aplicaciones y ha sido más ampliamente estudiado. También son conocidos como calcogenuros, puesto que el grupo 16 es el de los calcógenos y está conformado por el oxígeno (O), el azufre (S), el selenio (Se), el Teluro (Te), el polonio (Po, radiactivo) y el Livermorio (Lv, anteriormente Uuh). Los calcogenuros de cadmio son a su vez los más utilizados, específicamente el CdS, CdSe y CdTe.

Durante muchos años se ha investigado la forma en que podían obtenerse nanopartículas de estas moléculas de la forma más sencilla y con las propiedades ópticas idóneas [1].

2. SÍNTESIS DE CALCOGENUROS

Para sintetizar estas nanopartículas encontramos tres métodos generales: dos químicos (síntesis organometálica y síntesis acuosa) y uno biológico (biosíntesis).

2.1. Síntesis Organometálica

La llamada síntesis organometálica, que produce QDs (orQDs) de naturaleza hidrofóbica y que, por lo tanto, deben recubrirse con ligandos hidrofílicos o recubrimientos poliméricos o de sílica para hacerlas solubles en agua. Este tratamiento, sin embargo, va en detrimento de sus propiedades ópticas (aumenta su tamaño y disminuye su PLQY) y por lo tanto también merma su aplicabilidad.

2.2. Síntesis Acuosa

La síntesis más usada ha sido probablemente la acuosa (aqQDs), ya que generalmente es más simple, barata y respetuosa con el medio ambiente, además de que ya son estables en agua, puesto que están rodeadas de un gran número de ligandos hidrofílicos. No obstante, aunque esto se traduzca en un diámetro hidrodinámico pequeño sus propiedades ópticas suelen ser pobres. De hecho un campo muy activo ha sido la búsqueda de aqQDs con propiedades ópticas mejoradas [1], [2].

2.3. Síntesis Biológica (Biosíntesis)

Aunque los dos métodos químicos, descritos anteriormente, permiten obtener con éxito QDs, se han intentado desarrollar vías alternativas que fueran más limpias, biocompatibles, no tóxicas y respetuosas con el medio ambiente, como es el caso de la biosíntesis. Mediante el uso de microorganismos, se han propuesto una serie de métodos que permiten obtener QDs de forma barata, no tóxica, reproducible y a temperatura y presión ambientes. Para ello, se aprovechan los mecanismos naturales que los microorganismos tienen para protegerse de la acción de los metales pesados, como es el caso del Cd o el Zn. Existen varios mecanismos de tolerancia a estos metales: la modificación de sus sistemas de transporte en la membrana, la oxidación o reducción mediante enzimas, la alteración del flujo de iones y la precipitación con azufre, fósforo o biopolímeros [1].

3. ESTUDIO DE LA SÍNTESIS BIOLÓGICA

3.1. Cadistinas y Fitoquelatinas

El microorganismo pionero en estos estudios no es otro que la levadura de fisión, *Schizosaccharomyces pombe*. Es bien sabido que esta levadura unicelular ha sido clave en el conocimiento de la morfogénesis y el ciclo celular. Sin embargo, en 1981 [3], se descubre que en presencia de CdCl_2 , la levadura no sólo produce metalotioneínas (detoxificación de metales) sino que también se induce la formación de unos péptidos cortos que se unen al cadmio. En 1983 [4], se publica la estructura de la cadistina de *S. pombe*, determinándose posteriormente en otros organismos que la estructura general es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, o lo que es lo mismo $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$, siendo $n=3-4$. Esto significa que el enlace peptídico entre el glutamato y la cisteína se produce por el carbono γ (en vez de α que es lo usual) y que estos dímeros se repiten un cierto número de veces. En ese mismo artículo se les da el nombre de cadistinas, pero si $n=1$ la molécula es el glutatión y no se considera una de ellas. En 1985 se descubren los homólogos de las cadistinas en plantas, denominándose fitoquelatinas, nombre más extendido y general en la actualidad [5].

Entre diversos mutantes de *S. pombe* sensibles a Cd(II) , se encontraron algunos que no sintetizaban cadistina. De estos, unos poseían mutaciones en las enzimas implicadas en la síntesis del glutatión, la γ -glutamilcisteín sintetasa (ahora conocida como glutamato-cisteína ligasa) y la glutatión sintetasa. Esto corroboraba que también eran necesarias para la síntesis de las cadistinas, como era de suponer dada su similitud. Sin embargo, se encontraron mutantes incapaces de sintetizar cadistinas pero que tenían unos niveles totalmente silvestres de glutatión por lo que también debían existir enzimas específicas de la síntesis de cadistinas. No fue una sorpresa cuando poco después se identificaron en *Silene cucubalus* [6] y *S. pombe* [7] la enzima fitoquelatina sintasa, que mediante una transpeptidación permite obtener las fitoquelatinas. Sin embargo, no fue hasta 1999 cuando se comenzaron a aislar los genes que codifican para esta enzima. La mayoría se denominan *CAD1* y *PCS1* (en *S. pombe* es *pcs2* porque ya existía un *pcs1*), y están considerablemente conservados en plantas y levaduras [8].

3.2. Nanopartículas de CdS como Quantum Dots. Estudios en *S. pombe* y *C. galbrata*

Las cadistinas (o fitoquelatinas) tienen pues el papel de proteger al organismo de una alta concentración de ciertos iones metálicos mediante la acción quelante de estos péptidos contra los iones. Se propuso que el conjunto se estabiliza gracias al azufre [9] y que de hecho, los complejos que se forman debían consistir en un centro de CdS rodeado de los péptidos [10]. Desde muy pronto se supo los nanocristales de CdS en solución acuosa tenían características ópticas especiales [11]. Sin embargo, fue en 1989 cuando se publicó una carta en Nature que describía la biosíntesis de "cristalitos semiconductores cuánticos de CdS" en *S. pombe* y *Candida galbrata*, y donde por primera vez se propone su uso como Quantum dots, independien-

temente del estudio de la resistencia a Cd(II) de los organismos usados [12].

La formación de quantum dots en *S. pombe* y *C. galbrata* es bastante similar. En ambos casos se producen intracelularmente y con tamaños parecidos (1,8 y 2.0 nm, respectivamente, Figura 1) [13], ya que aunque extracelularmente también se producen unos agregados de cadmio no tienen las propiedades que deseamos [12]. Por lo tanto, para recuperar los nanocristales intracelulares debían romperse las células y separarlos del contenido celular junto con el que eran liberados al medio. No obstante, en 1996 se describe cómo en *S. pombe* sometiendo a las células a un proceso de congelación-descongelación se pueden extraer de forma selectiva las nanopartículas. Esto conlleva dos beneficios: que se purifica más fácilmente y que no destruimos las células de forma que pueden seguir produciendo [13]. De hecho, para que se induzca la formación de las nanopartículas también se ha observado que se debe añadir el cadmio al cultivo cuando este se encuentra en exponencial, y no en la fase lag o en la estacionaria [14]. También se han sintetizado estos QDs mediante cultivo en lote [14] y en lote alimentado [15] en un intento por maximizar su producción.

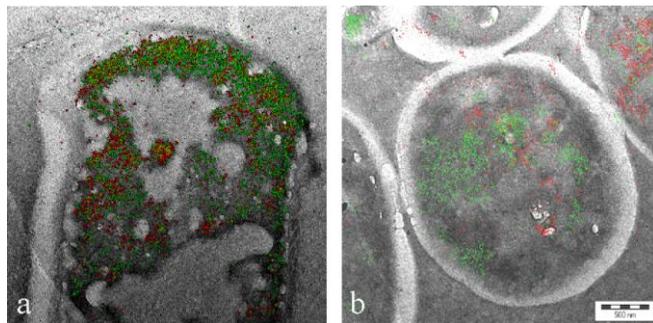


Figura 1. Imágenes EFTEM-ESI de *S. pombe* (a) y *C. galbrata* (b). El cadmio aparece en rojo y el azufre en verde. Hay una gran cantidad de cadmio en el interior celular que sin embargo, no es tóxico. Esto se debe a que está inmovilizado y recubierto. Como puede observarse, no hay grandes agregados debido a que lo que se obtienen son nanopartículas de no más de 2 nm [16]

3.3. Calcogenuros en otros organismos

La producción de quantum dots no es algo exclusivo de los organismos "modelo" que hasta ahora hemos comentado. Durante todo este tiempo se han identificado otros microorganismos que producen una variedad considerable de nanopartículas. Si seguimos centrándonos en los calcogenuros de cadmio iniciales encontramos que también se han producido quantum dots de CdS y CdTe en *Saccharomyces cerevisiae* [17], [18], de CdS y CdSe en el hongo *F. oxysporum* [19], [20] y de CdS, CdSe y CdTe en *E. coli* [21], [22], [23]. En las bacterias *Rhodospseudomonas palustris* [24], *Clostridium thermoaceticum* [25], *Klebsiella pneumoniae* [26], *Klebsiella aerogenes* [27] y *Gluconoacetobacter xylinus* [28] se han producido quantum dots de CdS con diferentes tamaños, formas y localizaciones. También en diversas plantas como *Linaria maroccana* [29]. Un caso curioso es el de diversas estirpes obtenidas de una muestra de suelo antártico, que eran capaces de producir estas

nanopartículas a baja temperatura [30]. El ejemplo más reciente es probablemente la producción de QDs de CdTe en gusanos de tierra [31].

4. PERSPECTIVAS FUTURAS

El estudio a nivel molecular de cómo las diferentes especies pueden producir QDs nos puede ofrecer vías de mejora que permitan controlar con precisión el tamaño, forma y estructura de las nanopartículas producidas, así como la optimización y escalado de la biosíntesis. Sin embargo, hasta que esto se consiga, la síntesis biológica no se plantea como una alternativa real a la síntesis organometálica o la acuosa. Además de los inconvenientes ya descritos, hay que tener en cuenta que el uso de microorganismos puede resultar complejo para personal inexperto en su cultivo y manipulación.

Por otro lado, a pesar de su aplicabilidad, se ha demostrado que los QDs basados en metales pesados son tóxicos también para las células en las que se usan: inducen respuestas a estrés que pueden alterar los resultados obtenidos durante el experimento o el diagnóstico. Al parecer, el hecho de que sean nanopartículas ya aporta un grado de citotoxicidad que *a priori* parece insalvable. Por ello se está poniendo mucho empeño en desarrollar nuevos QDs que al menos eliminen la citotoxicidad producida por los metales pesados. Que la síntesis biológica tenga cabida en este caso es algo aún por determinar.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al profesor Dr. Víctor Álvarez Tallada por hacerme entender que una levadura puede enseñarnos mucho sobre la vida.

REFERENCIAS

- [1] S. Mussa Farkhani and A. Valizadeh, "Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots," *IET nanobiotechnology*, vol. 8, no. 2, pp. 59–76, Jun. 2014.
- [2] N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, and C. Fan, "The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots," *Biomaterials*, vol. 33, no. 5, pp. 1238–1244, Mar. 2012.
- [3] A. Murasugi, A. Colony, and Y. Hayashi, "Cadmium-Binding Peptide Induced in Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*," *J. Biochem.*, vol. 90, no. 5, pp. 1561–1564, 1981.
- [4] N. Kondo, M. Isobe, T. Goto, A. Murasugi, and Y. Hayashi, "Structure of cadystin, the unit-peptide of cadmium-binding peptides induced in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*," *Tetrahedron Lett.*, vol. 24, no. 9, pp. 925–928, 1983.
- [5] E. Grill, E. L. Winnacker, and M. H. Zenk, "Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants," *Science*, vol. 230, no. 4726, pp. 674–676, Nov. 1985.
- [6] E. Grill, S. Löffler, E. L. Winnacker, and M. H. Zenk, "Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 18, pp. 6838–6842, Sep. 1989.
- [7] Y. Hayashi, C. W. Nakagawa, N. Mutoh, M. Isobe, and T. Goto, "Two pathways in the biosynthesis of cadystins (γ EC)_nG in the cell-free system of the fission yeast," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 69, no. 2–3, pp. 115–121, Feb. 1991.
- [8] S. Clemens, E. J. Kim, D. Neumann, and J. I. Schroeder, "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast," *EMBO J.*, vol. 18, no. 12, pp. 3325–3333, 1999.
- [9] R. N. Reese and D. R. Winge, "Sulfide Stabilization of the Cadmium- γ -Glutamyl Peptide Complex of *Schizosaccharomyces pombe*," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 26, pp. 12832–12835, 1988.
- [10] C. T. Dameron and D. R. Winge, "Peptide-mediated formation of quantum semiconductors," *TIBTECH*, vol. 8, pp. 3–6, 1990.
- [11] R. Rossetti, S. Nakahara, and L. E. Brus, "Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution," *J. Chem. Phys.*, vol. 79, no. 2, pp. 1086–1088, 1983.
- [12] C. T. Dameron, R. N. Reeses, R. K. Mehra, A. R. Kortan, P. J. Carrol, M. L. Steigerwald, L. E. Brus, and D. R. Winge, "Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites," *Nature*, vol. 338, pp. 596–597, 1989.
- [13] P. Williams, E. Keshavarz-Moore, and P. Dunnill, "Efficient production of microbially synthesized cadmium sulfide quantum semiconductor crystallites," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 19, no. 3, pp. 208–213, 1996.
- [14] P. Williams, E. Keshavarz-Moore, and P. Dunnill, "Production of cadmium sulphide microcrystallites in batch cultivation by *Schizosaccharomyces pombe*," *J. Biotechnol.*, vol. 48, no. 3, pp. 259–267, 1996.
- [15] P. Williams, E. Keshavarz-Moore, and P. Dunnill, "*Schizosaccharomyces pombe* fed-batch culture in the presence of cadmium for the production of cadmium sulphide quantum semiconductor dots," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, no. 3, pp. 354–362, 2002.
- [16] N. Krumov, S. Oder, I. Perner-Nochta, A. Angelov, and C. Posten, "Accumulation of CdS nanoparticles by yeasts in a fed-batch bioprocess," *J. Biotechnol.*, vol. 132, no. 4, pp. 481–6, Dec. 2007.
- [17] H. Huang, M. He, W. Wang, J. Liu, C. Mi, and S. Xu, "Biosynthesis of CdS quantum dots in *Saccharomyces cerevisiae* and spectroscopic characterization," *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, vol. 32, no. 4, pp. 1090–1093, Apr. 2012.
- [18] H. Bao, N. Hao, Y. Yang, and D. Zhao, "Biosynthesis of biocompatible cadmium telluride quantum dots using yeast cells," *Nano Res.*, vol. 3, no. 7, pp. 481–489, 2010.

- [19] A. Ahmad, P. Mukherjee, D. Mandal, S. Senapati, M. I. Khan, R. Kumar, and M. Sastry, "Enzyme Mediated Extracellular Synthesis of CdS Nanoparticles by the Fungus, *Fusarium oxysporum*," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 41, pp. 12108-12109, Oct. 2002.
- [20] S. A. Kumar, A. A. Ansary, A. Ahmad, and M. I. Khan, "Extracellular Biosynthesis of CdSe Quantum Dots by the Fungus, *Fusarium Oxysporum*," *J. Biomed. Nanotechnology*, vol. 3, no. 2, pp. 190-194, 2007.
- [21] R. Y. Sweeney, C. Mao, X. Gao, J. L. Burt, A. M. Belcher, G. Georgiou, and B. L. Iverson, "Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals," *Chem. Biol.*, vol. 11, pp. 1553-1559, 2004.
- [22] Z. Yan, J. Qian, Y. Gu, Y. Su, X. Ai, and S. Wu, "Green biosynthesis of biocompatible CdSe quantum dots in living *Escherichia coli* cells," *Mater. Res. Express*, vol. 1, no. 1, p. 015401, Mar. 2014.
- [23] H. Bao, Z. Lu, X. Cui, Y. Qiao, J. Guo, J. M. Anderson, and C. M. Li, "Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 9, pp. 3534-3541, Sep. 2010.
- [24] H. J. Bai, Z. M. Zhang, Y. Guo, and G. E. Yang, "Biosynthesis of cadmium sulfide nanoparticles by photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 70, no. 1, pp. 142-146, Apr. 2009.
- [25] D. P. Cunningham and L. L. Lundie, "Precipitation of cadmium by *Clostridium thermoaceticum*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, no. 1, pp. 7-14, 1993.
- [26] J. D. Holmes, D. J. Richardson, S. Saed, R. Evans-, D. A. Russell, and J. R. Sodeaul, "Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by *Klebsiella pneumoniae*," *Microbiology*, vol. 143, pp. 2521-2530, 1997.
- [27] H. Aiking, H. Govers, and J. van 't Riet, "Detoxification of mercury, cadmium, and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 50, no. 5, pp. 1262-1267, Nov. 1985.
- [28] X. Li, S. Chen, W. Hu, S. Shi, W. Shen, X. Zhang, and H. Wang, "In situ synthesis of CdS nanoparticles on bacterial cellulose nanofibers," *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, no. 4, pp. 509-512, 2009.
- [29] M. N. Borovaya, A. P. Naumenko, N. A. Matvieieva, Y. B. Blume, and A. I. Yemets, "Biosynthesis of luminescent CdS quantum dots using plant hairy root culture," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 9, no. 1, pp. 1-7, 2014.
- [30] C. Gallardo, J. P. Monras, D. O. Plaza, B. Collao, L. A. Saona, V. Duran-Toro, F. A. Venegas, C. Soto, G. Ulloa, C. C. Vasquez, D. Bravo, and J. M. Perez-Donoso, "Low-temperature biosynthesis of fluorescent semiconductor nanoparticles (CdS) by oxidative stress resistant Antarctic bacteria," *J. Biotechnol.*, vol. 187, pp. 108-115, Oct. 2014.
- [31] S. R., HocknerM., PanneerselvamA., LevittJ., BouillardJ-S., TaniguchiS., DaileyL-A., R. A. Khanbeigi, R. V., ThanouM., SuhlingK., Z. V., and GreenM., "Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm," *Nat Nano*, vol. 8, no. 1, pp. 57-60, Jan. 2013.



Rafael Hoyos Manchado es graduado en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide. Actualmente cursa el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria de dicha Universidad.

Nanotecnología para el tratamiento de la artritis reumatoide

María Trujillo Rodríguez

Resumen— La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que afecta a las articulaciones sinoviales y puede causar incapacidad funcional. A pesar de la amplia gama de tratamientos disponibles para curar esta enfermedad, existen limitaciones, como la especificidad y las reacciones adversas, que hacen que estos tratamientos no sean del todo eficaces. La nanotecnología ofrece estrategias prometedoras para mejorar y optimizar el tratamiento de esta enfermedad. Esta revisión se centra, principalmente, en estrategias basadas en la liberación dirigida de fármacos a las zonas deseadas.

Palabras Claves— Artritis, Citoquinas, PEG, siRNA, TNF α

1. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune sistémica, crónica e inflamatoria que afecta, principalmente, a las articulaciones sinoviales, provocando dolor, hinchazón y rigidez. También causa discapacidad progresiva ya que, si la inflamación persiste, puede provocar daño en los huesos, ligamentos y tendones próximos, y reducir la movilidad articular, disminuyendo así la calidad de vida del enfermo [1, 2].

La causa de esta enfermedad no se conoce, solo se sabe que la autoinmunidad juega un papel importante, ya que el sistema inmune ataca a las células inmunitarias que invaden la membrana sinovial. Los linfocitos, las células plasmáticas, los fibroblastos y los macrófagos son las principales células que se acumulan en el tejido sinovial inflamado y en el fluido sinovial de las articulaciones afectadas (Fig. 1). Los macrófagos son los principales secretores de citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF α y la IL-1 β , responsables, junto con las IL-6 y IL-18, de destruir la articulación mediante la activación de los fibroblastos sinoviales y la producción de metaloproteinasas [1, 2].

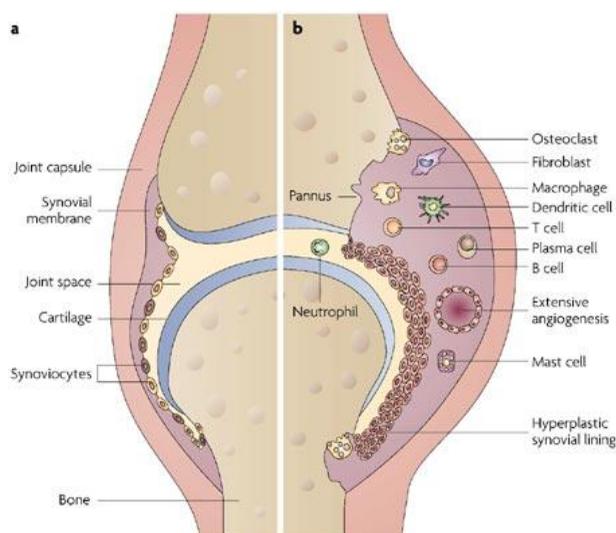


Fig. 1: a) Imagen de una articulación sinovial sana. b) Imagen de una articulación sinovial con artritis reumatoide. [3]

2. TRATAMIENTO

Los tratamientos actuales están enfocados a aliviar el dolor, controlar la inflamación de las articulaciones sinoviales y retrasar la progresión de la enfermedad. Los más comunes son:

- a) Fármacos antiinflamatorios no esteroideos: proporcionan un alivio sintomático pero no previenen el daño articular. La mayoría de estos fármacos actúan inhibiendo la ciclooxigenasa (COX),

enzima responsable de catalizar la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas, mediadores principales del proceso de inflamación. Así, la inhibición de la COX por estos fármacos conduce a una reducción del dolor y la inflamación [2].

- b) Glucocorticoides: se usan también para reducir la inflamación mediante la inhibición de la acumulación de macrófagos y la reducción de la permeabilidad capilar [2].
- c) Fármacos anti-reumáticos: ayudan a prevenir el daño en las articulaciones. El *metotrexato* (MTX) es uno de los más utilizados ya que disminuye la inflamación a través del metabolismo del ácido fólico, necesario para el crecimiento de las células. La *sulfasalazina*, la *hidroxicloroquina* y la *leflunomida* también se usan para tratar esta enfermedad [2].
- d) Agentes biológicos: son medicamentos que se han diseñado para inhibir citoquinas y moléculas de superficie que intervienen en la patogénesis de dicha enfermedad. Entre ellos destacan *etanercept* e *infliximab*, ambos inhibidores del TNF α ; *anakinra*, un antagonista del receptor de la IL-1 y *abatacept* que inhibe la coestimulación de las células T [2].

Sin embargo, el mayor problema de estos tratamientos es la falta de especificidad y la aparición de efectos secundarios en otros órganos y tejidos. En este sentido, los recientes avances en nanotecnología han proporcionado nuevas estrategias para el transporte y entrega de fármacos, de forma dirigida, en el tejido deseado, minimizando así los posibles efectos secundarios (TABLA 1) [1].

Entre estas estrategias nanotecnológicas destacan los nano-vehículos, que son entidades, de un diámetro de 10-1000 nm, que pueden englobar en su interior a un fármaco, protegiéndolo así de posibles interacciones con proteínas plasmáticas e inmunoglobulinas presentes en medios fisiológicos y permitiéndole atravesar membranas celulares.

En el caso de la artritis reumatoide, los fármacos encapsulados en estos nano-vehículos tienen como objetivo principal la supresión de las citoquinas inflamatorias responsables de esta enfermedad.

Como se ha comentado anteriormente, el TNF α , la IL-1, IL-6 e IL-18 son las principales citoquinas implicadas en la inflamación de las articulaciones, por lo que una estrategia prometedora para tratar la artritis reumatoide sería silenciar la expresión de estas citoquinas con pequeños RNA de interferencia (siRNA) [1]. La interferencia por RNA es un mecanismo específico, ya que existe una complementariedad de bases entre la molécula de siARN y la molécula de ARNm.

TABLA 1: RESUMEN DE LAS ESTRATEGIAS NANOTECNOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE [1]

Diana	Estrategia nanotecnológica	Efecto inmune
TNF α	Liposoma catiónico con siRNA	Supresión citoquinas inflamatorias
TNF α	Nanopartículas de PLGA con siRNA	Supresión citoquinas inflamatorias
TNF α	Complejo "wrap-some" con siRNA	Supresión citoquinas inflamatorias
TNF α	Nanopartículas de quitosano con siRNA	Supresión citoquinas inflamatorias
TNF α	Certolizumab pegol	Neutraliza la función del TNF α
IL-1, IL-6 e IL-18	Liposoma catiónico con siRNA	Supresión citoquinas inflamatorias
VIP	Micelas estéricas	Supresión de las respuestas Th1 y Th17

Estos siRNA, debido a su alto peso molecular y su naturaleza polianiónica, son englobados en nano-vehículos que facilitan su transporte hasta el citoplasma de los macrófagos. Estos nano-vehículos pueden ser:

- a) **Liposomas catiónicos:** son vesículas nanométricas formadas por bicapas lipídicas cargadas positivamente, en las que la parte polar se sitúa hacia el interior de la vesícula y hacia el medio externo, mientras que la parte apolar queda hacia el interior de la membrana (Fig. 2). Por tanto, ofrecen un entorno lipofílico y un entorno acuoso, adecuados para la administración de fármacos con diferentes solubilidades y perfiles (hidrofóbico, hidrofílico y anfipático). Además, los liposomas están compuestos de materiales biodegradables y no tóxicos para la célula, por lo que no desencadenan ninguna respuesta inmunogénica [2, 4].

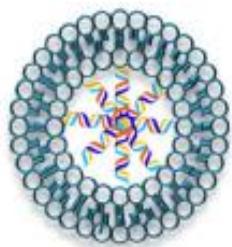


Fig. 2. Estructura de un liposoma catiónico con siRNA en su interior [1].

- b) **Nanopartículas PLGA:** El PLGA o ácido poli(láctico-co-glicólico) es un polímero sintético generado a través de la reacción de polimerización entre el ácido glicólico y láctico. Este polímero es uno de los más usados entre los diferentes polímeros desarrollados para formular nanopartículas (Fig. 3), debido a una serie de propiedades: (i) es biodegradable y biocompatible, (ii) ha sido aprobado por la FDA y la Agencia de Medicina Europea como un sistema de administración de fármacos por la vía parenteral, (iii) protege al fármaco de la degradación, (iv) permite dirigir nanopartículas a órganos o células específicas, y (v) existen distintas formulaciones y métodos de producción adaptados a diversos tipos de drogas [5, 6].

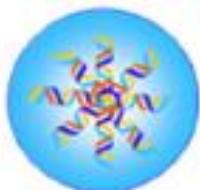


Fig. 3. Estructura de una nanopartícula PLGA con siRNA en su interior [1].

- c) **Complejo "wrapsome":** es un vehículo que permite el suministro de siRNA y que ha sido diseñado recientemente con un núcleo compuesto por una bicapa de lípido catiónico y el complejo siRNA, que está envuelto en una bicapa de lípidos neutros con polietilenglicol en la superficie (Fig. 4). La ventaja de este complejo es que como la capa externa está compuesta de fosfolípidos neutros y está pegilada, se evita la unión del complejo a las proteínas plasmáticas y a las membranas de las células epiteliales. Además, esta bicapa lipídica protege al siRNA de la digestión enzimática y aumenta la vida media del complejo en la circulación sistémica, causando así una entrega eficiente del siRNA a la membrana sinovial inflamada debido a la permeación vascular en los tejidos inflamatorios [7].

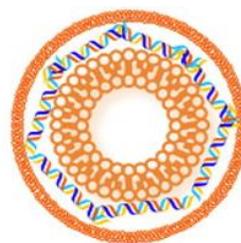


Fig. 4. Estructura de un wrapsome con siRNA en su interior [1].

- d) **Nanopartículas de quitosano:** el quitosano es un polímero natural formado por moléculas de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. Es uno de los polímeros naturales más utilizados para la administración de fármacos, ya que muestra características importantes como: su carácter poliaciónico, su solubilidad en medio acuoso, su biodegradabilidad y su baja inmunogenicidad (Fig. 5). Sin embargo, su propiedad más atractiva es la capacidad de adherirse a las superficies mucosas, lo que permite una mayor penetración del fármaco y un mayor tiempo de residencia prolongada en los sitios de absorción [8, 9, 10].

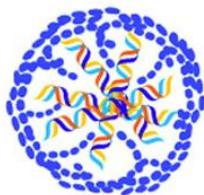


Fig. 5. Estructura de una nanopartícula de quitosano con siRNA en su interior [1].

Además de estos nano-vehículos que engloban en su interior siRNA, existen otras estrategias nanotecnológicas para el tratamiento de la artritis reumatoide:

- a) Certolizumab pegol (CZP): es un fármaco anti-TNF α que reconoce y neutraliza al TNF α humano, tanto el soluble como el que se encuentra unido a membranas. Este fármaco tiene una estructura distinta al resto de los anti-TNF α (Fig. 6), ya que carece de región Fc y tiene un fragmento Fab' de un anticuerpo monoclonal murino humanizado unido a dos moléculas de polietilenglicol (PEG). Esta pegilación le confiere características importantes, ya que aumenta la solubilidad y estabilidad del fármaco y el tiempo de vida media en sangre, permitiendo así una mayor distribución a los tejidos inflamados [11, 12, 13].

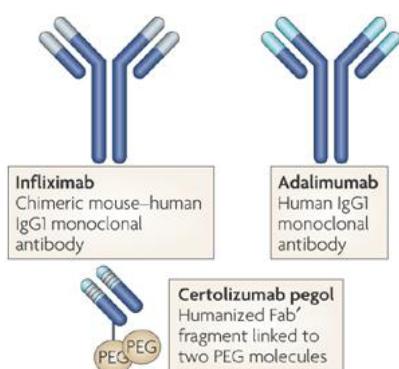


Fig. 6. Estructura de fármacos anti-TNF α [13].

- b) Micelas estabilizadas estéricamente: son estructuras esféricas en las que las colas apolares de los fosfolípidos se sitúan hacia el interior, mientras que las cabezas polares hacia el exterior, entrando en contacto con el agua. A estas micelas se les agregan moléculas de PEG, convirtiéndolo-

las así en buenos sistemas de liberación de fármacos, ya que el PEG mejora la estabilidad, seguridad y bioactividad de éstos.

Para el tratamiento de la artritis, estas micelas engloban el péptido intestinal vasoactivo (VIP), ya que posee acciones antiinflamatorias y una gran variedad de funciones que controlan la homeostasis innata del sistema inmunitario, como son la inhibición de la fagocitosis, del estallido respiratorio, de la quimiotaxis, de la proliferación de células T y de la producción de agentes pro-inflamatorios en las articulaciones inflamadas y células sinoviales, como TNF α , IL-6, IL-1 β , iNOS, IL-12 e IL-18 (Fig. 7) [14, 15].

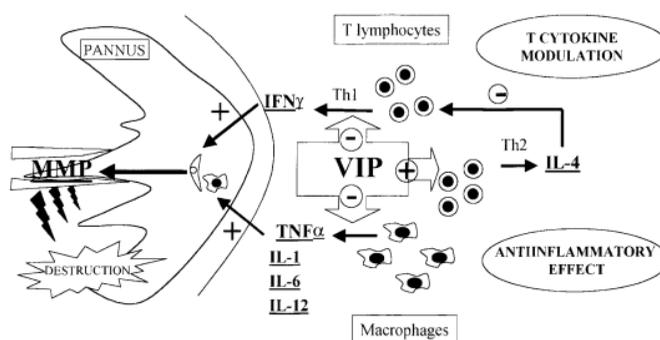


Fig. 7. Esquema de la regulación negativa llevada a cabo por VIP [14].

3. CONCLUSIONES

La artritis reumatoide es una enfermedad que sigue un curso progresivo y deformante, ya que puede provocar la destrucción de las articulaciones. Los tratamientos aquí descritos consiguen controlar el dolor y la inflamación, evitando así el deterioro funcional y mejorando la calidad de vida de los pacientes, pero no logran la remisión de la enfermedad. La nanotecnología ofrece estrategias innovadoras que optimizan estos tratamientos, como son los nano-vehículos, que permiten englobar en su interior fármacos y siRNA dirigidos contra las citoquinas responsables de la patogenia de la enfermedad. Sin embargo, estos nano-vehículos son muy novedosos y por ello requieren de más investigación.

REFERENCIAS

- [1] Marjan Gharagozloo, Slawomir Majewski, Marianna Foldvari. Therapeutic applications of nanomedicine in autoimmune diseases: From immunosuppression to tolerance induction. *Nanomedicine: NBM* 2015; xx:1-15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2014.12.003>
- [2] Bhupinder Kapoor, Sachin Kumar Singh, Monica Gulati, Reena Gupta, Yogyata Vaidya. Application of Liposomes in Treatment of Rheumatoid Arthritis: Quo Vadis. *The Scientific World Journal* 2014: 978351 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/978351>
- [3] Josef S. Smolen and Günter Steiner. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003. 2(6): 473-88
- [4] Maroun Khoury, Virginie Escriou, Gabriel Courties, Anne Galy, Roseline Yao, Céline Largeau, Daniel Scherman, Christian Jorgensen, Florence Apparailly. Efficient Suppression of Murine Arthritis by Combined Anticytokine Small Interfering RNA Lipoplexes. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2356-67, <http://dx.doi.org/10.1002/art.23660>.
- [5] Bernard C.M. te Boekhorst, Linda B. Jensen, Stefano Colombo, Amir K. Varkouhi, Raymond M. Schiffelers, Twan Lammers, Gert Storm, Hanne M. Nielsen, Gustav J. Strijkers, Camilla Foged, Klaas Nicolay. MRI-assessed therapeutic effects of locally administered PLGA nanoparticles loaded with anti-inflammatory siRNA in a murine arthritis model. *Journal of Controlled Release* 2012, 161: 772-780.
- [6] Fabienne Danhier, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, Véronique Préat. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 2012, 161: 505-522 doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043
- [7] Yukiko Komano, Nobuhiro Yagi, Ikumi Onoue, Kayoko Kaneko, Nobuyuki Miyasaka, Toshihiro Nanki. Arthritic joint-targeting small interfering RNA-encapsulated liposome: implication for treatment strategy for rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 340:109-13, <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.111.185884>
- [8] Jun Jie Wang, Zhao Wu Zeng, Ren Zhong Xiao, Tian Xie, Guang Lin Zhou, Xiao Ri Zhan, Shu Ling Wang. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 765-74. doi: 10.2147/IJN.S17296
- [9] Antonio Rampino, Massimiliano Borgogna, Paolo Blasi, Barbara Bellich, Attilio Cesàro. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, 455: 219-228 doi:10.1016/j.ijpharm.2013.07.034
- [10] Kenneth A Howard, Søren R Paludan, Mark A Behlke, Flemming Besenbacher, Bent Deleuran, Jørgen Kjems. Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF-alpha knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model. *Mol Ther* 2009, 1: 162-8. doi: 10.1038/mt.2008.220
- [11] Theresa Barnes, Robert Moots. Targeting nanomedicines in the treatment of rheumatoid arthritis: focus on certolizumab pegol. *Int J Nanomedicine* 2007, 2(1): 3-7.
- [12] Sofia Ramiro, Astrid M van Tubergen, Robert BM Landewé. RAPID and FAST4WARD trials: certolizumab pegol for rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2010, 6(5): 713-20. doi: 10.1586/eci.10.67.
- [13] Gil Y. Melmed, Stephan R. Targan, Uma Yasothan, Delphine Hanicq, Peter Kirkpatrick. Certolizumab pegol. *Nature Reviews Drug Discovery* 2008, 7: 641-642 | doi:10.1038/nrd2654
- [14] M. Delgado, C. Abad, C. Martinez, M.G. Juarranz, A. Arranz, R.P. Gomariz, J. Leceta. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med* (2002) 80: 16-24 doi 10.1007/s00109-001-0291-5

- [15] Varun Sethi, Israel Rubinstein, Antonina Kuzmis, Helen Kastrissios, James Artwohl, Hayat Onyuksel. Novel, Biocompatible, Disease Modifying Nanomedicine of VIP for Rheumatoid Arthritis. *Mol Pharm* 2013, **10**(2): 728–738. doi:10.1021/mp300539f.



María Trujillo Rodríguez recibió el título de Graduada en Bioquímica por la Universidad de Córdoba en 2014. Actualmente, es estudiante de la Universidad Pablo de Olavide (Máster de Biotecnología Sanitaria).

Aplicaciones biomédicas del Grafeno

José Miguel Vélez Ortiz

Resumen—El grafeno es un nanomaterial con múltiples aplicaciones en numerosas ciencias, entre ellas la biomedicina debido a sus propiedades únicas. Así, se han desarrollado numerosas variantes de este material en esta disciplina. Por ejemplo, se han desarrollado modificaciones para usarlo como biosensor de biomoléculas de importancia vital, como la glucosa, se ha utilizado en terapia fototérmica y génica, en el estudio de bioimágenes, en ingeniería tisular y como sistema liberador de fármacos.

Palabras Claves — Aplicaciones biomédicas, Biosensor, Grafeno, Liberación de fármacos, Terapia antitumoral.

1. INTRODUCCIÓN.

El grafeno es un nanomaterial reciente, bidimensional, compuesto únicamente por carbono y dispuesto en planos hexagonales de extrema delgadez (un átomo de espesor), similar a un panal de abejas. Su estructura está compuesta por la superposición de orbitales sp^2 de los carbonos enlazados. Entre sus características hay que destacar su alta conductividad térmica ($5000 \text{ m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), su gran elasticidad y dureza, su elevada área superficial ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$), su ligereza y su transparencia. Su síntesis es relativamente fácil y tiene numerosas variantes, como el óxido de grafeno (GO). Este tipo de grafeno está enriquecido con oxígeno, es biocompatible, estable fisiológicamente y capaz de transportar fármacos, biomoléculas y material genético. Estas características le otorgan al grafeno llevar a cabo gran variedad de aplicaciones biomédicas [1].

En artículos de números anteriores de la revista *MoleQla* se han tratado los métodos de producción del grafeno (Nº8, Dic. 2012) [2], y algunas de sus aplicaciones, como la creación de transistores de grafeno, motores más eficientes e incluso el desarrollo de aplicaciones relacionadas con las energías renovables (Nº 0, Dic. 2010) [3]. Son tales las propiedades de este nanomaterial, que le han permitido alcanzar también el ámbito de la biomedicina. En este artículo se revisarán las aplicaciones del grafeno y sus derivados en el campo biomédico. Por ejemplo, su uso en biosensores de biomoléculas, en terapia fototérmica y génica, en el estudio de bioimágenes, en ingeniería tisular y como sistemas de liberación de fármacos.

2. APLICACIONES BIOMÉDICAS DEL GRAFENO

2.1. Grafeno como biosensor

Las biomoléculas son los constituyentes básicos de los seres vivos, llevando a cabo funciones vitales en todos los procesos biológicos. Por esto, las alteraciones en su composición o concentración se relacionan con el desarrollo de enfermedades. Así, la detección rápida y eficaz de estas biomoléculas es realmente crucial en el diagnóstico y desarrollo de terapias adecuadas. En este sentido, el grafeno puede utilizarse como biosensor para la detección de estas biomoléculas.

Su alta sensibilidad y rápida respuesta, junto con su elevada superficie, su buena conductividad, su posibilidad de interactuar con varias biomoléculas y sus excelentes propiedades electroquímicas, hacen de éste un biosensor electroquímico verdaderamente eficaz.

Gracias al grafeno se pueden detectar moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Aunque el H_2O_2 no forma parte de la familia de radicales libres, está relacionado con su síntesis a través de varias reacciones químicas (Ej. Reacción de Fenton) involucradas en procesos neurodegenerativos [4]. Además, está implicado en numerosas vías de señalización que actúan, por ejemplo, en el control del ciclo celular [5]. La detección de H_2O_2 por metodologías convencionales no es realmente exacta, debido a la presencia de numerosas especies que interfieren en la medición. Se ha reportado que el N-grafeno, un grafeno con grupos funcionales de nitrógeno permite una detección precisa del H_2O_2 [6].

Otra biomolécula relevante en el metabolismo es la glucosa, cuya detección se realiza de forma rutinaria para el tratamiento y diagnóstico de la diabetes. Se han realizado modificaciones de este nanomaterial, obteniendo una detección más sensible (hasta 0,02 mM) que la realizada utilizando otros nanomateriales y métodos convencionales [7].

Otro ejemplo es la dopamina, neurotransmisor cuya concentración regula varios procesos, y su disminución en el cerebro está relacionada con patologías como la enfermedad de Parkinson, que conduce a la destrucción progresiva de neuronas. Debido a sus propiedades electroquímicas, la dopamina puede detectarse usando grafeno. Sin embargo, parece ser que existen otras biomoléculas capaces de interferir en la medición, como es el caso de ácido ascórbico, con un potencial de oxidación muy similar. Para evitar esto se han desarrollado derivados del grafeno capaces de realizar una detección sensible de la dopamina en un rango de 5 μM hasta 200 μM [8].

Por otra parte, el grafeno ha demostrado ser capaz de realizar una cuantificación rápida, reproducible y versátil del ADN y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en compara-

ción con las técnicas convencionales, más laboriosas y complejas [9]. En este campo destaca el GO. La capacidad del GO para emitir fluorescencia en un amplio intervalo de longitud de onda (desde el infrarrojo cercano al ultravioleta) le permite actuar como *quencher* de otros marcadores fluorescentes. Esto permite la utilización del GO para la cuantificación y detección de ADN. Por ejemplo, el ADN de cadena simple (ssADN) se une fácilmente a la superficie del nanomaterial a través de interacciones hidrofóbicas entre las bases nucleotídicas y las regiones aromáticas del grafeno, proporcionándole además protección contra las nucleasas. Esta interacción del GO con ssDNA marcado con un fluorocromo conduce a la pérdida de la fluorescencia. Tras la adición de la secuencia de ADN complementaria (o proteína de unión), se forma la secuencia de doble cadena de ADN (o el dímero ADN-proteína) y el ADN se libera de la superficie debido al aumento de la rigidez. Al separarse de la plataforma se produce la recuperación de la fluorescencia perdida que es ya cuantificable. Esto tendría importantes aplicaciones en el estudio de la existencia de mutaciones en genes responsables de enfermedades, o la presencia de material genético de patógenos [10,11] (Figura 1).

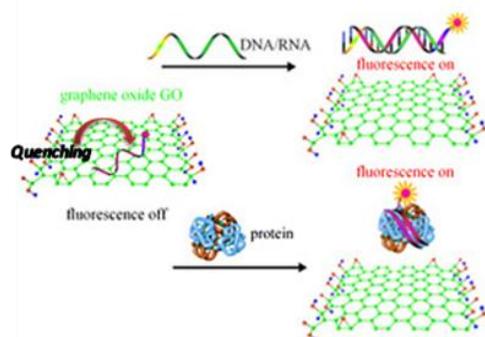


Figura 1. Cuantificación de ADN usando GO mediante el análisis de fluorescencia. Modificado de [10].

Esta estrategia también permite la detección de proteínas como la trombina, un marcador de varias enfermedades cardiovasculares [12].

2.2. Grafeno en aplicaciones de bioimagen.

Varios investigadores han introducido moléculas fluorescentes, como Cy7, en el GO a través de puentes con polietilenglicol (PEG) para elaborar hojas de nano-grafeno con el objetivo de realizar estudios de imagen de enfermedades como el cáncer (Figura 2a). Así, se ha descubierto que varias líneas celulares murinas de cáncer de mama y células de glioblastoma humanas poseen una alta eficiencia de captación de este nanomaterial lo que permite su análisis por fluorescencia [13].

Otro ejemplo es el uso de conjugados de GO (marcado con con ^{64}Cu) con anticuerpos monoclonales, como TRC105, para reconocer específicamente al marcador de angiogénesis CD105, relacionado con procesos tumorales. El análisis mediante tomografía por emisión de positrones (PET) permite localizar un posible tumor. Además, esta construcción parece permitir la unión de fármacos anticancerígenos o realizar terapia fototérmica sin la necesidad de utilizar técnicas inva-

sivas (Figura 2b) [14].

Otra conjugación a destacar del grafeno se realiza con *quantum dots* (QDs). Los QDs son fluoróforos con fluorescencia intrínseca, que también pueden ser usados para estudios de imagen [15].

2.3. Grafeno en la liberación de fármacos.

La mayoría de los fármacos que se integran en la superficie del nanomaterial tienen estructuras formadas por dominios aromáticos. La elevada área superficial, el hecho de estar formado por la superposición de orbitales sp^2 de carbonos enlazados enriquecidos con grupos que incorporan oxígeno, y su biocompatibilidad y estabilidad en condiciones fisiológicas, le hacen ser un eficiente transportador de fármacos. Además, el GO puede incorporar PEG y quitosano mediante enlaces covalentes para alterar el perfil de su circulación en sangre, mejorando aún más su biocompatibilidad [16]. También es posible añadir al GO moléculas de ácido fólico junto con fármacos antitumorales, aumentando la selectividad del tratamiento debido a la sobreexpresión de receptores de ácido fólico en algunos tipos de tumores [17].

En otros experimentos se ha sintetizado un conjugado de GO-PEG con Rituximab (anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20, altamente expresado en algunos tipos de cáncer, como los linfomas) para la liberación de fármacos antitumorales, como la Doxorubicina (DOX) (Figura 3a), provocando una disminución significativa de la viabilidad de las células tumorales (Figura 3b). Además, la liberación de fármacos de la superficie del GO es pH-dependiente, lo que permite la liberación controlada del fármaco [17].

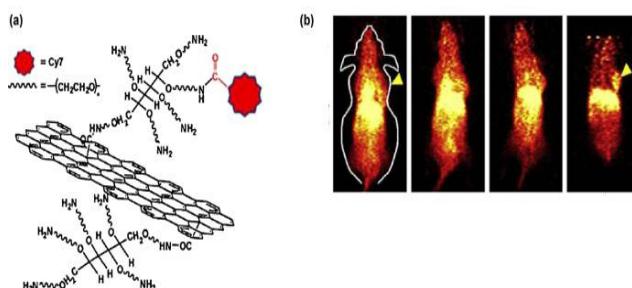


Figura 2. Aplicaciones del grafeno en análisis de imágenes. a) Construcción GO-PEG-Cy7 [1]. b) Localización del tumor utilizando la construcción GO-PEG-Cy7 mediante la detección por fluorescencia [14].

Este nanomaterial permite la liberación de otros tipos de fármacos, como los antiinflamatorios. Así, se han elaborado conjugados de GO, quitosano e ibuprofeno [1].

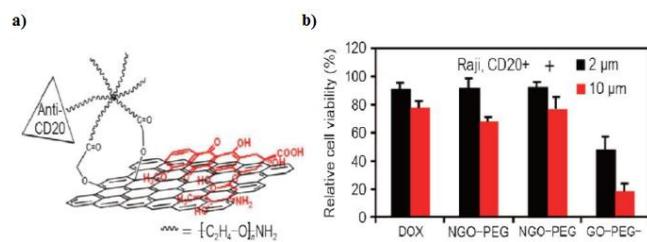


Figura 3. a) Construcción GO-PEG-Anticuerpo anti-CD20; b) Medida de la viabilidad de células cancerígenas *in vitro* tras la suministración de diferentes concentraciones de DOX y usando plataformas de grafeno conjugados [17].

2.4. Grafeno y terapia génica.

Las cargas negativas que se encuentran en el GO pueden ser utilizadas para establecer interacciones electrostáticas con polímeros cargados positivamente como la polietiliminina (PEI). Este polímero puede ser utilizado para proporcionar carga positiva a la plataforma de grafeno, permitiéndole conjugar moléculas de ADN y ARN, cargadas negativamente [18].

Por otra parte, se puede combinar la liberación de fármacos con ARN interferente (ARNi). La unión covalente de PEI a GO facilita la unión y liberación del ARNi, encargado de inhibir la expresión de una proteína concreta. Esto se ha probado en células HeLa con el objetivo de evitar la sobreexpresión de Bcl-2, a la vez que se favorece la liberación del fármaco anti-tumoral DOX. Esta técnica disminuyó, significativamente, la viabilidad de las células tumorales [19].

2.5. Grafeno y terapia fototérmica.

El GO puede absorber energía en el espectro cercano al infrarrojo (700-1100 nm) y posteriormente emitir energía en forma de calor, produciendo así la ablación térmica de tejidos específicos. El mecanismo de ablación fototérmica se debe a la producción de especies reactivas de oxígeno, la activación de caspasas, la despolimerización de la membrana mitocondrial y la fragmentación del ADN. La combinación de estos factores es suficientemente potente como para lograr que las células que están a una distancia específica de la plataforma de grafeno entren en apoptosis. En este sentido, el grafeno tiene una eficacia similar a los nanotubos de carbono, aunque requiere menores concentraciones y absorbe radiaciones menos energéticas, lo que evita alteraciones en los tejidos sanos [16].

2.7. Grafeno y su actividad antimicrobiana.

El grafeno también posee una gran actividad bactericida. El GO provoca la ruptura de la membrana y, aunque no se detecta producción de anión superóxido en el proceso, estos materiales pueden oxidar el glutatión, alterando el estado redox de la bacteria (Figura 4). Esta característica permitirá al grafeno recubrir vendajes y apósitos, facilitando la cura de heridas al disminuir la posibilidad de que se produzcan infecciones [20].

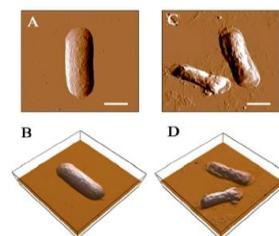


Figura 4. Imagen 3D de *Escherichia coli* después de incubación con GO. Control sin tratar (A y B); incubación de *E.coli* con 40 µg/mL de una suspensión de GO durante 2 horas (C y D) [20].

2.8. Grafeno, ingeniería tisular y cultivos.

Los materiales basados en carbono, como el grafeno, se están empezando a utilizar para la creación de andamios para el cultivo celular y para fomentar la diferenciación celular. Se ha demostrado que el grafeno se puede utilizar como soporte para el cultivo de una línea celular de fibroblastos (NIH-3T3), ya que posibilita una proliferación y adhesión correcta. Además, este nanomaterial parece aumentar la eficiencia de transfección en un 250% [21]. También hay que destacar la utilidad del grafeno en la capacidad de diferenciación de células madre mesenquimales, similar a los obtenidos usando protocolos de diferenciación convencionales [22].

Además, las propiedades de la superficie del grafeno permiten el mantenimiento, en un estado indiferenciado, de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y posibilita una rápida adhesión. Por el contrario, derivados del grafeno como el GO parecen favorecer la diferenciación en las tres líneas germinales [23].

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

Gracias a sus propiedades únicas, el grafeno y sus derivados han ido ganando un enorme peso en la investigación, innovación y desarrollo en el campo de biomedicina. Así, a partir del grafeno se están desarrollando biosensores, se está investigando su capacidad de transportar fármacos, su uso en terapia génica, fototérmica, ingeniería tisular, etc. Su rápido y prometedor desarrollo en aplicaciones biomédicas posibilitará, en el futuro, la sustitución de las metodologías convencionales. Así, este continuo desarrollo implicará la elaboración de análisis toxicológicos exhaustivos tanto *in vivo* e *in vitro* de este nanomaterial, así como la optimización de protocolos de síntesis, evitando falsas expectativas y problemas sanitarios derivados. Así, no cabe duda de que en un futuro, no tan lejano, el grafeno y sus derivados se considerarán herramientas potentes, principalmente en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

REFERENCIAS

- [1] He Shen, Liming Zhang, Liming Zhang, Min Liu, and Zhijun Zhang. "Biomedical Applications of Graphene". *Theranostics* 2012; 2(3):283-294. doi: 10.7150/thno.3642
- [2] Vigara Astillero, G. "Grafeno, el material del futuro. ¿posibilidad real o pura fantasía?". *Revista MoleQla*, nº8. Sevilla: Universidad Pablo de Olavide, Diciembre

2012. Págs. 62-65.
- [3] Gamero Estévez, E. "Grafeno: la panacea tecnológica", Revista MoleQla, nº0. Sevilla: Universidad Pablo de Olavide, Diciembre Diciembre de 2010. Págs. 60-61.
- [4] Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options". *Curr Neuropharmacol*. 2009 Mar; **7**(1):65-74. doi: 10.2174/157015909787602823.
- [5] Li M, Zhao L, Liu J, Liu AL, Zeng WS, Luo SQ, Bai XC. "Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts". *Anat Rec (Hoboken)*. 2009 Aug; **292**(8):1107-13. doi: 10.1002/ar.20925.
- [6] Wang Y, Shao Y, Matson DW, Li J, Lin Y. "Nitrogen-doped graphene and its application in electrochemical biosensing". *ACS Nano*. 2010 Apr **27**;4(4):1790-8. doi: 10.1021/nn100315s.
- [7] Kang X, Wang J, Wu H, Aksay IA, Liu J, Lin Y. "Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing". *Biosens Bioelectron*. 2009 Dec **15**;25(4):901-5. doi: 10.1016/j.bios.2009.09.004.
- [8] Kim YR, Bong S, Kang YJ, Yang Y, Mahajan RK, Kim JS, Kim H. "Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes". *Biosens Bioelectron*. 2010 Jun **15**;25(10):2366-9. doi: 10.1016/j.bios.2010.02.031.
- [9] Xu H, Yang Q, Li F, Tang L, Gao S, Jiang B, Zhao X, Wang L, Fan C. "A graphene-based platform for fluorescent detection of SNPs". *Analyst*. 2013 May **7**;138(9):2678-82. doi: 10.1039/c3an36740a.
- [10] Lu CH, Yang HH, Zhu CL, Chen X, Chen GN. "A graphene platform for sensing biomolecules". *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009; **48**(26):4785-7. doi: 10.1002/anie.200901479.
- [11] Ying Fen Duan, Yi Ning, Yang Song, Le Deng. "Fluorescent aptasensor for the determination of *Salmonella typhimurium* based on a graphene oxide platform". *Microchimica Acta* April 2014, Volume 181, Issue 5-6, pp 647-653. doi: 10.1007/s00604-014-1170-4
- [12] Xie L, You L, Cao X. "Signal amplification aptamer biosensor for thrombin based on a glassy carbon electrode modified with graphene, quantum dots and gold nanoparticles". *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013 May **15**;109:110-5. doi: 10.1016/j.saa.2013.02.017.
- [13] Yang K, Zhang S, Zhang G, Sun X, Lee ST, Liu Z. "Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy". *Nano Lett*. 2010 Sep **8**;10(9):3318-23. doi: 10.1021/nl100996u.
- [14] Hong H, Yang K, Zhang Y, Engle JW, Feng L, Yang Y, Nayak TR, Goel S, Bean J, Theuer CP, Barnhart TE, Liu Z, Cai W. "In vivo targeting and imaging of tumor vasculature with radiolabeled, antibody-conjugated nanographene". *ACS Nano*. 2012 Mar **27**;6(3):2361-70. doi: 10.1021/nn204625e.
- [15] Wang X, Sun X, Lao J, He H, Cheng T, Wang M, Wang S, Huang F. "Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery". *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Oct **1**;122:638-44. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.07.043.
- [16] Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K. "Prospects and challenges of graphene in biomedical applications". *Adv Mater*. 2013 Apr **24**;25(16):2258-68. doi: 10.1002/adma.201203700.
- [17] Huang P, Xu C, Lin J, Wang C, Wang X, Zhang C, Zhou X, Guo S, Cui D. "Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy". *Theranostics*. 2011 Apr **13**;1:240-50.
- [18] Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K. "Prospects and challenges of graphene in biomedical applications". *Adv Mater*. 2013 Apr **24**;25(16):2258-68. doi: 10.1002/adma.201203700.
- [19] Zhang L, Lu Z, Zhao Q, Huang J, Shen H, Zhang Z. "Enhanced chemotherapy efficacy by sequential delivery of siRNA and anticancer drugs using PEI-grafted graphene oxide". *Small*. 2011 Feb **18**;7(4):460-4. doi: 10.1002/smll.201001522.
- [20] Liu S, Hu M, Zeng TH, Wu R, Jiang R, Wei J, Wang L, Kong J, Chen Y. "Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets". *Langmuir*. 2012 Aug **21**;28(33):12364-72. doi: 10.1021/la3023908.
- [21] Ryoo SR, Kim YK, Kim MH, Min DH. "Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies". *ACS Nano*. 2010 Nov **23**;4(11):6587-98. doi: 10.1021/nn1018279.
- [22] Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, Ee PL, Ahn JH, Hong BH, Pastorin G, Özyilmaz B. "Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells". *ACS Nano*. 2011 Jun **28**;5(6):4670-8. doi: 10.1021/nn200500h.
- [23] Chen GY, Pang DW, Hwang SM, Tuan HY, Hu YC. "A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation". *Biomaterials*. 2012 Jan; **33**(2):418-28.



José Miguel Vélez Ortiz. Graduado en Bioquímica por la Universidad de Córdoba. Actualmente cursa el primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Nanomedicina: Nuevas terapias para el tratamiento de la diabetes.

Blanca Navarrete Ruiz de Clavijo

Resumen—La diabetes mellitus afecta a 366 millones de personas en el mundo. A falta de una cura para esta enfermedad, la nanotecnología ofrece varias alternativas que podrían utilizarse como terapia y que mejorarían la calidad de vida, a largo plazo, de las personas que la padecen. El campo de la nanomedicina está centrándose en la búsqueda de un sistema que permita sensar la concentración de glucosa en sangre y secretar insulina, en respuesta a dichos niveles y en dosis adecuadas. El principio de estas nuevas terapias es la utilización de la enzima glucosa oxidasa (GOx), como sensor de la glucosa, y nanopartículas sensibles a variaciones de pH. La GOx cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico, causando una disminución del pH en la zona. Esta variación en el ambiente provoca que las nanopartículas modifiquen su estructura permitiendo la liberación de insulina en estas condiciones. En este artículo se describen dos estructuras que llevan incorporado este mecanismo, un dispositivo implantable y un hidrogel inyectable. Ambos sistemas han dado buenos resultados *in vivo*, trasplantados a ratones diabéticos, abriendo una puerta a nuevas alternativas en la búsqueda de una cura para la diabetes en humanos.

Palabras Claves— Diabetes, GOx, Insulina, Nano-network, Nanopartícula sensibles a pH.



1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una afección crónica que se desencadena cuando el organismo pierde su capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla con eficacia. La insulina es una hormona producida en el páncreas, más concretamente por las células beta pancreáticas, cuya función principal es mantener bajos los niveles de glucosa en sangre. Una persona con diabetes no absorbe la glucosa adecuadamente, de modo que ésta queda circulando en la sangre (hiperglucemia) y dañando los tejidos con el paso del tiempo. Este deterioro causa complicaciones para la salud potencialmente letales.

Hay dos tipos principales de diabetes: diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. La diabetes tipo 1, es considerada una enfermedad autoinmune y metabólica, que se produce cuando los linfocitos T atacan y destruyen por error las células beta pancreáticas productoras de insulina, necesarias para regular los niveles altos de glucosa en sangre. La diabetes tipo 2 se caracteriza por una combinación de factores genéticos y ambientales que afectan a la capacidad del organismo para responder a las acciones de la insulina, aunque ésta se secreta de forma normal.

En la actualidad, las personas con diabetes suelen pincharse los dedos varias veces al día para extraer una pequeña muestra de sangre y comprobar los niveles de azúcar circundantes. Cuando los niveles son altos, estos pacientes se inyectan a sí mismos insulina, que disminuye el exceso de azúcar. Este procedimiento de “autoadministración” de insulina puede llegar a ser peligroso debido a un mal control de la glucosa en sangre, pudiendo producirse las llamadas “complicaciones crónicas de la diabetes”, como la amputación de extremidades, ceguera y fallo hepático. Por otro lado, la hipoglucemia puede

resultar en riesgos de ataques epilépticos, daño cerebral e incluso la muerte [1]. La inyección diaria de insulina es tan sólo un método paliativo y no supone, ni mucho menos, la cura de la enfermedad. Por lo que diferentes campos científicos, entre ellos la nanotecnología, se encuentran actualmente en la búsqueda de nuevas terapias alternativas.

Estos últimos años la nanomedicina ha desarrollado un gran avance, tanto en la manipulación, como en las aplicaciones de las nanopartículas, abriendo una puerta a la búsqueda de nuevas terapias contra un gran número de enfermedades de diverso tipo, entre ellas la diabetes[2].

2. NANOTECNOLOGÍA Y DIABETES

En ausencia de una cura definitiva para la diabetes mellitus, la obtención de un dispositivo que monitorice la concentración de glucosa y libere insulina según dicha concentración, sería una buena alternativa a las inyecciones de insulina [3]. Varios han sido los experimentos y avances llevados a cabo por investigadores del campo de la nanomedicina. En este artículo se comentarán dos posibles sistemas que aseguran la liberación de cantidades adecuadas de insulina en respuesta a la glucosa en sangre. El principio de estos sistemas se basa en la integración de un elemento que mida la glucosa, y un mecanismo que libere la insulina en dosis adecuadas [4]

Diversos grupos de investigación se han centrado en el desarrollo de biomateriales para lograr un buen sistema de liberación de insulina controlado químicamente, utilizando enzimas como sensores. La mayoría de los sistemas incorporan la enzima glucosa oxidasa (GOx) en hidrogel, membranas o biopolímeros que cambian su conformación en respuesta a cambios de pH [5-7]. La GOx cataliza la conversión de la glucosa a ácido glucónico en

presencia de oxígeno, liberando peróxido de hidrógeno.

En los siguientes apartados hablaremos de dos sistemas que utilizan el mecanismo explicado anteriormente: un dispositivo de liberación de insulina con una membrana de nanopartículas, y un hidrogel con estructura reticular compuesto de nanopartículas poliméricas

2.1. Dispositivo de liberación de insulina con membrana de nanopartículas

El grupo de Claudia R. Gordijo [3] ha desarrollado un dispositivo de liberación de insulina en respuesta a los niveles de glucosa en sangre, que puede ser implantado en el paciente gracias a su pequeño tamaño (3 cm) (Figura 1.b).

El dispositivo está compuesto por un reservorio de insulina y, en uno de los extremos, una membrana de nanopartículas que mide los niveles de glucosa y libera insulina en un ratio adecuado a dichos niveles. La membrana consiste en una matriz reticular formada por la unión de albúmina de suero bovino (BSA) y nanopartículas de MnO_2 , en la que se encuentran embebidos la GOx, la catalasa (CAT), encargada de eliminar el peróxido de hidrógeno que se produce en la reacción -incrementando la vida media de la GOx-, y nanopartículas de poli (niso-propilacrilamida-co-ácido-metacrílico) (poli (NIPAM-MAA)). La elección de nanopartículas de MnO_2 se debe a su función estabilizadora de las enzimas. Cuando la GOx cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico se produce una disminución de pH en la zona, creando un microambiente en la membrana. Este cambio de pH, hace que las nanopartículas de poli(NIPAM-MAA), que forman el hidrogel, encojan y se formen unos pequeños poros en la membrana que permiten el paso de la insulina desde el reservorio al exterior [8], de manera que, cuando la concentración de glucosa es elevada, el pH disminuye de forma considerable y se libera la insulina al organismo. Por otro lado, cuando los niveles de glucosa vuelven a sus estados basales, el pH aumenta y los poros se cierran (Figura 1.a.i).

El pequeño tamaño del dispositivo (3 cm) y su forma plana permiten que sea fácil de implantar y extraer subcutáneamente o intraperitonealmente en ratas. Además está fabricado con una silicona médica altamente utilizada en clínica y, para hacerlo más biocompatible, la superficie del dispositivo se modificó con diversas técnicas: silanización y PEGilación (Figura 1.a.ii). La silanización permitió que la membrana de hidrogel se mantuviese unida covalentemente al depósito de insulina. Las superficies externas del dispositivo fueron PEGiladas aumentando, en gran medida, su biocompatibilidad, mediante la reducción de la respuesta inmune del huésped. La insulina muestra problemas de agregación cuando se encuentra en altas concentraciones o en contacto con superficies hidrofóbicas [9]. Para evitar este proceso, el grupo de Gordijo, ha estabilizado la solución en la que se encuentra la hormona, añadiendo un surfactante no iónico, el n-octil- β -D-glucopiranosido (Figura 1.b.iii). Además, gracias a la silanización de la superficie del dispositivo, ésta se vuelve más hidrofílica y se evita la posible agregación de la insulina en las paredes internas.

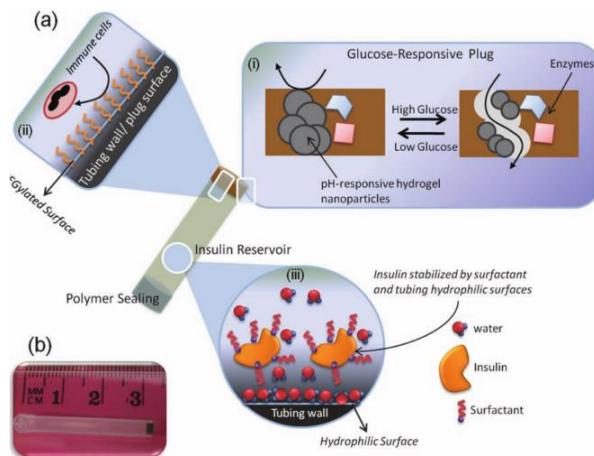


Figura 1. Dispositivo implantable para la liberación de insulina en respuesta a los niveles de glucosa en sangre [3]. (a) Composición del dispositivo. (i) Mecanismo de la membrana sensora de glucosa. (ii) Modificaciones de la superficie del dispositivo. (iii) Interior del reservorio de insulina. (b) Fotografía del dispositivo.

2.1.1 Experimentos *in vitro* e *in Vivo*

En experimentos *in vitro* se demostró que la liberación de insulina puede ser modulada en función de la concentración de glucosa. El perfil de liberación de insulina mostró un patrón típico pulsátil cuando la concentración de glucosa se alternó entre los niveles normales y de hiperglucemia en varios ciclos (Figura 2.a). En experimentos *in vivo* se confirmó que la glucemia de las ratas diabéticas se puede controlar con la implantación intraperitoneal del dispositivo de insulina. Además, la glucosa en sangre de las ratas diabéticas se redujo a niveles normales rápidamente, lo que demuestra la eficacia de la administración de insulina en respuesta a la glucosa del dispositivo implantado (Figura 2.b).

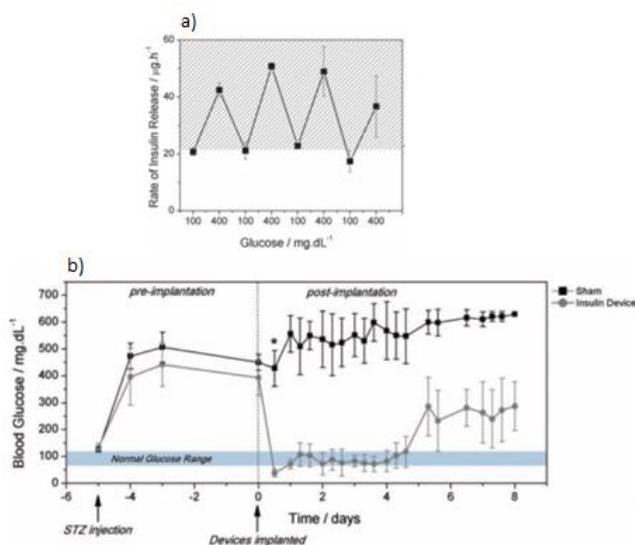


Figura 2. Resultado de los estudios *in vitro* e *in vivo* del dispositivo [8]. a) Estudio *in vitro* de la secreción de insulina en respuesta a diferentes niveles de concentración de glucosa. b) Estudio *in vivo* de la concentración de glucosa en sangre en ratones diabéticos (control) y ratones con el dispositivo implantado

2.2. Nano-network

Otro gran avance en la terapia contra la diabetes ha sido llevado a cabo por el grupo de Zhen Gu [10], que ha desarrollado una estructura reticular de nanopartículas poliméricas inyectable en el paciente, al que denominan nano-network. Esta "nano-red" es capaz de liberar glucosa en respuesta a los niveles de glucosa en sangre. La red está compuesta por nanopartículas de m-dextrano (una modificación del dextrano que lo hace sensible a variaciones de pH), con cargas opuestas para que interactúen entre sí y se unan por fuerzas electrostáticas para crear la estructura reticular. Esta red forma una estructura tridimensional estable y con poros suficientemente grandes para dejar pasar a la glucosa.

Las nanopartículas están formadas por cuatro componentes: una matriz polimérica de m-dextrano, revestida con polielectrolitos para otorgarle cargas en la superficie, las enzimas GOx y CAT, encapsuladas, e insulina recombinante (Figura 3, a). El dextrano ha sido seleccionado por ser biocompatible, biodegradable y fácil de modificar, de hecho, se ha modificado de manera que se le añaden ciertos ligandos para que sea soluble en compuestos orgánicos y, además, sensible a cambios de pH (se degrada) (Figura 3.b)). Para conseguir las cargas opuestas en las nanopartículas, se han unido a la superficie de las nanopartículas polielectrolitos muy utilizados en clínica, el quitosano (carga positiva) y el alginato (carga negativa). Gracias a la presencia de estas dos cargas en la nanopartícula, hay zonas donde las cargas se atraen formando una fuerte interacción y zonas donde hay repulsión y que constituyen los poros, que permiten la entrada de la glucosa en la nano-network.

Cuando la glucosa en sangre es alta, entra por los poros de la estructura reticular y es convertida en ácido gluconico por la acción de la GOx, haciendo que el ambiente local sea ligeramente más ácido. Ese entorno ácido hace que las esferas de dextrano se desintegren, provocando la liberación de insulina desde su interior (Figura 3.c)).

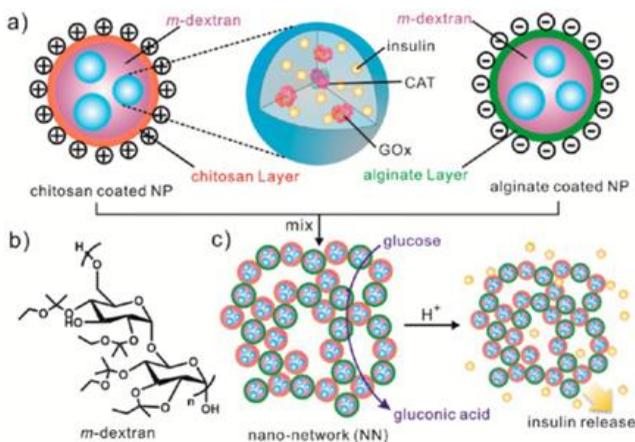


Figura 3. Nano-network [10]. a) Estructura de las nanopartículas. b) Estructura química del m-dextrano. c) Estructura y mecanismo de acción de la nano-network.

2.2.1 Experimentos *in vitro* e *in Vivo*

Para medir la capacidad de la nano-network de liberar inulina en respuesta a la glucosa, se realizaron experimentos *in vitro* en los que se sometía a la nano-network a concentraciones alternas de glucosa variando entre niveles de hipoglucemia e hiperglucemia. Los resultados demostraron una alta liberación de insulina cuando los niveles de glucosa eran elevados y una inhibición de la secreción de insulina cuando los niveles de glucosa disminuían (Figura 4.a).

También se realizaron experimentos *in vivo*, donde inyectaban el nano-network a ratones diabéticos y medían la concentración de glucosa durante dos meses. Los resultados demostraron que una sola inyección del gel mantiene los niveles de azúcar normales durante un promedio de 10 días. Se realizaron también pruebas *in vivo* en la que se efectuaban inyecciones de glucosa a los ratones con y sin nano-network para estudiar la eficacia del mismo (Figura 4.b), obteniéndose una respuesta similar en ambos ratones.

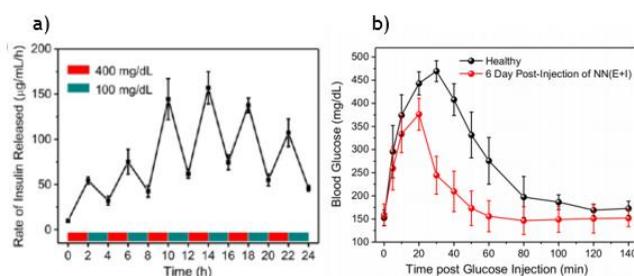


Figura 4. Resultado de los experimentos *in vivo* e *in vitro* de la nano-network [16]. a) Estudio *in vitro* de liberación de insulina alternando niveles de hipoglucemia y de hiperglucemia. b) Estudio *in vivo* administrando una inyección de glucosa a ratones normales (control) y en ratones después de 6 días de la inyección de la nano-network.

5. CONCLUSIONES

Hoy en día no existe una cura para la diabetes, sólo métodos que reducen los efectos de padecerla. Estos tratamientos requieren la constante monitorización de la glucosa en sangre con la consiguiente inyección de insulina por parte del paciente, que puede llegar a ser fatigoso al igual que peligroso, si no se realiza de la forma adecuada. Debido a esto, es esencial la búsqueda de nuevas alternativas. Los dos avances mencionados en este artículo permiten nuevos tratamientos para esta enfermedad que podrían asegurar el mantenimiento equilibrado de los niveles de azúcar en sangre y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Estas nuevas aplicaciones se basan en un sensor de glucosa que permite una liberación de insulina en las dosis adecuadas, presentado en dos formatos diferentes, un dispositivo implantable y un hidrogel que puede inyectarse. Como se ha mencionado, ambos sistemas han dado buenas expectativas, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*, para su utilización en clínica.

Sin embargo, los sistemas de hidrogel han dado una baja respuesta a los cambios en la concentración de glucosa, y las membranas con GOx pueden sufrir pequeñas roturas mecánicas que podrían provocar una liberación de insulina prematura. Actualmente, los investigadores están tratando de modificar las partículas para que puedan responder a los cambios en los niveles de glucosa más rápido, para llegar a la velocidad de las células de los islotes del páncreas, antes de ser implantadas en seres humanos.



Blanca Navarrete Ruiz de Clavijo. Recibió el título de Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla en 2013. Actualmente es estudiante del Master en Biotecnología sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide

REFERENCIAS

- [1] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. "The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus". *The New England Journal of Medicine*, vol 329, pp. 977-986; **1993**
- [2] M.L. Etheridge, S.A. Campbell, A.G. Erdman, C.L. Haynes, S.M. Wolf, J. Mccullough. "The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products". *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vo 9, pp 1-14; **2013**.
- [3] C. R. Gordijo, K. Koulajian, A. J. Shuhendler, L. D. Bonifacio, H. Y. Huang, S. Chiang, G. a. Ozin, A. Giacca, and X. Y. Wu, "Nanotechnology-enabled closed loop insulin delivery device: In vitro and in vivo evaluation of glucose-regulated insulin release for diabetes control," *Advanced Functional Materials*, vol. 21, pp. 73–82; **2011**.
- [4] V. Ravaine, C. Ancla, B. Catargi. "Chemically Controlled Closed-Loop Insulin Delivery." *The Journal of Controlled Release*, vol 132 pp. 2–11; **2008**.
- [5] K. Podual, F.J. Doyle III, N.A. Peppas "Preparation and Dynamic Response of Cationic Copolymer Hydrogels Containing Glucose Oxidase". *Polymer Journal* 2000, vol 41, pp. 3975–3983; **2000**.
- [6] K. Podual, F.J. Doyle, N. A. Peppas. "Glucose-Sensitivity of Glucose Oxidase-Containing Cationic Copolymer Hydrogels Having Poly(ethylene glycol) Grafts". *The Journal of Controlled Release*, vol 67, pp. 9–17; **2000**.
- [7] C. R. Gordijo, K. Koulajian, A. J. Shuhendler, L. D. Bonifacio, H. Y. Huang, S. Chiang, G. a. Ozin, A. Giacca, and X. Y. Wu. "Nanotechnology-Enabled Closed Loop Insulin Delivery Device: In Vitro and In Vivo Evaluation of Glucose- Regulated Insulin Release for Diabetes Control" *Advanced Functional Materials*, vol 21, pp. 73–82; **2011**
- [8] C. R. Gordijo, A. J. Shuhendler, and X. Y. Wu, "Glucose-responsive bioinorganic nanohybrid membrane for self-regulated insulin release," *Advanced Functional Materials*., vol. 20, pp. 1404–1412, **2010**.
- [9] L. Nielsen, R. Khurana, A. Coats, S. Frokjaer, J. Brange, S. Vyas, V. N. Uversk, A. L. Fink. "Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism". *Biochemistry*, vol 40, 6036-6046; **2001**.
- [10] Z. Gu, A. a Aimetti, Q. Wang, T. T. Dang, Y. Zhang, O. Veiseh, H. Cheng, R. S. Langer, and D. G. Anderson, "Injectable nano-network for glucose-mediated insulin delivery.," *ACS Nano*, vol. 7, pp. 4194–201, **2013**.

Técnicas espectroscópicas aplicadas al análisis de pigmentos afectados por cambios degenerativos, producidos por el fuego

Llucia Bosch Rubio

Resumen— El artículo presente trata de establecer una síntesis de las recientes aportaciones realizadas por distintos equipos de investigación, a partir de la combinación de técnicas espectroscópicas sobre el campo de la caracterización de pigmentos que, por efecto del fuego, han sufrido cambios y mutaciones.

Palabras Claves— Policromía, espectroscopia, pigmentos, fuego.

Llucia Bosch Rubio. Universidad Pablo de Olavide. lluciabr@restaura.org.

1. INTRODUCCIÓN

Se llaman colores a las distintas áreas visibles del espectro solar y pigmento a la sustancia más o menos coloreada que, fijada por un aglutinante, constituye el estrato pictórico. Estos pigmentos, pueden clasificarse en distintas categorías, según su origen: naturales o artificiales, orgánico e inorgánicos, sintéticos, etc. Y es en parte por ese origen y composición, por lo que reaccionan de distinta forma ante factores de alteración.

En el presente artículo, se realizará un estado de la cuestión sobre el estudio de uno de dichos factores; y cómo las técnicas espectroscópicas aportan datos para establecer las propiedades específicas de pigmentos que han padecido cambios degenerativos a causa del efecto del fuego.

1.1 Mecanismos de alteración del fuego

El fuego, constituye un desafortunado agente de deterioro, cuyo origen más habitual es:

- Natural: rayos
- Fortuito: por incidentes como descuidos, cortocircuitos, etc.
- Provocado: por actos vandálicos

Las alteraciones que producidas por los efectos del fuego se desarrollan mediante el contacto con las llamas, intensificadas por el cambio de temperatura y la fuerza con la que se proyecta el agua utilizada por los bomberos al apagar las llamas. Hay que tener en cuenta además, los efectos del humo y del calor. Un desafortunado ejemplo de estos efectos, se encuentra en la tabla de la Virgen del Perdón [1], obra de Simon Pereyns (s.XVI), afectada por un incendio que duró 3h y cuya temperatura ambiental no disminuyó hasta 24h más tarde, quemándose el 80% de la obra.

Para la evaluación de los efectos del fuego sobre los pigmentos, hay que tener en cuenta el tipo de soporte sobre el que se encuentren, puesto que dependiendo de su composición tendrá distintos comportamientos; los soportes de madera, al ser un material combustible que se descompone químicamente a temperaturas superiores a 120°, originan carbón y gases inflamables. La resina se funde a partir de 100°C y un incendio puede suponer la exposición de la obra a 230°C.

A estas temperaturas, las capas de imprimación compuestas por aglutinantes oleosos (por su contenido en aceite), se ven afectadas por el calor durante el incendio, generando burbujas en la capa pictórica.

La degeneración de los pigmentos es una de las patologías que desvirtúa e impide la lectura original de la obra. Por los efectos del calor y las reacciones químicas provocadas, pueden llegar a desvanecerse o tornar su coloración. Por lo que se hace necesaria la identificación de su composición, no sólo para estudiar el comportamiento y deterioro del pigmento, sino también para ofrecer datos sobre el entorno socio-económico del artista e incluso establecer patrones para el uso de determinados métodos de intervención.

En pintura mural, el fuego generalmente no destruye completamente el estrato pictórico, sino que tiende a transformarlo en una obra monocroma, debido al hecho de que los pigmentos tierras entre los 300 y 700°C se tornan tierra tostada, tendiendo al rojo-bruno. Estos efectos son los que podemos observar en pinturas como las de Frauenchiemsee o las de Pompei [2].

1.2. Métodos de investigación aplicada

Recientemente se han realizado algunos estudios en instituciones como el Museo Nacional de Arte de Catalunya [3], la Universidad de Sevilla [4] o la Universidad de Granada [5]; relacionados con el análisis de las alteraciones provocadas por el fuego sobre los pigmentos.

Dichas investigaciones, tenían como objetivo la evaluación del proceso de deterioro provocado por el fuego, a través de la experimentación con probetas, reconstruyendo el proceso de alteración y su temperatura asociada.

En la metodología seguida por los grupos de investigación, se recrearon los estratos pictóricos a partir de las técnicas descritas en las fuentes bibliográficas como la de Cennino Cennini [6]. A continuación se sometieron a procesos de temperatura controlada (entre 100 y 1000°C), y finalmente se interpretaron los datos proporcionados con ayuda de técnicas instrumentales, tales como la espectroscopia o la microscopia óptica electrónica. En el

caso de la investigación de los pigmentos de Sixena [7] alterados por un incendio, se monitorizó la temperatura y se utilizó la difracción de rayos X para la investigación de las principales transformaciones mineralógicas del pigmento, que conducían a la alteración del color.

2. TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA APLICADAS

Las principales técnicas espectroscópicas descritas por los equipos de investigación son:

➤ Espectroscopia óptica de emisión UV-visible:

Aplicado para el análisis de sustancias que absorben en el campo del visible, el UV y el IR. Su principio básico se basa en la correlación entre la absorción de energía por parte de una sustancia (que puede ser elemental o molecular) y la longitud de onda de la radiación incidente; pudiendo analizar minerales de composición muy variada. El estudio cuantitativo se basa en la proporción directa entre la absorción y la concentración de un analito cuando es irradiado por una luz monocromática. Los resultados se observan en forma de espectro cualitativo representado por un trazo continuo en el que los puntos relacionan la absorción con la longitud de onda; y un valor numérico que representa la concentración del analito en la solución analizada [8].

➤ SEM-EDX: Normalmente se usa para el estudio de materiales de naturaleza inorgánica, a partir de una biopsia sólida insertable en la cámara de vacío del instrumento. Un pequeño rayo de electrones incide en la muestra, que emite un mínimo de tres tipos de señales distintas que se recogen y visualizan en un tubo catódico, fotografiado o digitalizado. Este proceso pone de manifiesto tanto la estructura tridimensional de la muestra, como la distribución de los elementos de distinto peso atómico; que en este caso tiene el fin de estudiar la composición elemental de la capa pictórica y la determinación de los pigmentos [9].

➤ Espectroscopia IR (FTIR). Este análisis permite la identificación de grupos funcionales los compuestos orgánicos e inorgánicos, a través de biopsias en polvo, líquido o escamas, de los distintos estratos pictóricos. El método es como el de la espectrofotometría, con la medida de la energía residual tras traspasar una radiación a través de la muestra en examen [10].

4. OBSERVACIONES

La espectroscopia IR de transmisión fue utilizada para determinar qué zonas de los frescos de Sixena afectadas por el incendio, eran originalmente azules. Se identificó el pigmento como aerinita, un pigmento azul inorgánico, sobre el cual se determinó también que se degeneraba totalmente a los 400°C, a 800°C recristalizaba en forma de augita y a 1000°C obtenían hematite. Con técnicas complementarias como la termodifracción, se establecen el momento en que un pigmento como la azurita se degenera en otro producto, como la tenorita, por decarbonatación a altas temperaturas. Este último es el caso estudiado

en la Universidad de Granada, sobre experimentos de descomposición del pigmento azurita.

Mediante la espectroscopia óptica de emisión UV-visible se detectaron los aglutinantes oleosos con fluorescencia característica de color naranja brillante, en el retablo de la Virgen del Perdón analizado en México.

Por otra parte, las pruebas analizadas con MEB y EDX por el mismo laboratorio, se realizaron con pigmentos en contenido en el interior de capas, estudiadas en cortes transversales. Con los resultados, se observó una modificación de un pigmento azul y su decoloración por reacción, mediante el experimento de aplicación de temperatura controlada. Con esta técnica, se detectaron también los efectos del fuego en la estratigrafía de la base y los cambios morfológicos y topográficos provocados por la temperatura en los minerales y el aglutinante, en vista superior y transversal.

En el caso de los pigmentos de Pompei, se concluyó que los tierra eran extremadamente estables, a excepción de los amarillos, los cuales formaron goethita y hematites, variando el color del amarillo ocre al rojo anaranjado; debido a la incidencia de los efectos de la erupción del Vesuvio. Así mismo, se detectó que algunos de los colores actualmente marrones, eran en realidad verdes, cuyos elementos (O, Mg, Al, Si, K y Fe) fueron identificados mediante SEM-EDX. Con el estudio de las secciones transversales, se descubrió que los pigmentos fueron utilizados con una o varias capas sobre el intonaco, con intención de dar distintas sensaciones colorimétricas.

5. CONCLUSIONES

Las técnicas espectroscópicas, en combinación con otras técnicas instrumentales, ofrecen en la mayoría de las veces, resultados de gran precisión con un coste medio; determinando en estos casos, datos cualitativos que ayudan a identificar los pigmentos que en origen daban color a las policromías estudiadas. Ya no solo en el caso concreto en el que influye la acción del fuego, sino también pueden ser útiles para determinar las posibles alteraciones que pueden producirse en los pigmentos, por la acción de tratamientos tales como la limpieza con láser.

Finalmente, dichas técnicas son usadas en general como métodos de caracterización material, que en este contexto se orientan a establecer los cambios morfológicos y alteraciones en la estructura pictóricas y transiciones de fase cristalina; por comparación con resultados experimentales obtenidos de las probetas artificiales.

REFERENCIAS

- [1] A.A.V.V *Efectos del fuego en la Virgen del Perdón, tabla novohispana del siglo XVI*. Revista Ge-iic, nº0, 2009 www.revista.ge-iic.com (consulta el 24/12/2014) pp.79-98
- [2] A.A.V.V. *Project report of pigment analyses of the fourth style wall paintings in the casa di Marco Lucrezio (IX 3, 5.24) in Pompeii*. Evtel University of Applied Sciences. Research Reports, 2007.

• P. Pouli, D.C. Emmony. *The effect of Nd: YAG laser radiation on medieval pigments*. Éditions scientifiques es médicales Elsevier; Leicestershire, 2000.

[3] En la exposición que tuvo lugar en su sede en el 2012 con título *El Museu Expora*, el público podía observar los resultados de las probetas experimentales, sobre las que se había aplicado calor controlado para estudiar sus efectos sobre el pigmento.

[4] A.A.V.V. *La interdisciplinariedad en la conservación de los bienes culturales: análisis de muestras de pigmentos afectados de cambios degenerativos*. III Congreso del Grupo Español del IIC. pp.387-396.

[5] A.A.V.V. *An in-situ X-ray Powder Thermodiffraction Study of Azurite Decarbonation*. Revista macla nº11, septiembre 2009. pp. 47-49.

[6] C. Cennini, *El libro del Arte*, 1437.

[7] A.A.V.V. *Heat Alteration of the Blue Pigment Azurite: Application to Sixena's Romanesque Frescoes*. Revista Macla nº12, junio 2012.

[8] S. Volpin; L. Appolonia, *Le analisi di laboratorio applicate ai beni artistici policromi*. Editoriale Il Prato. Padova, 2002. pp. 62-64.

[9] M.L. Gómez; *La restauración. Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*. Cuadernos de Arte Cátedra. Madrid, 2004. pp. 209.

[10] M.Matteini; A. Moles. *Ciencia y restauración. Método de investigación*. Editorial Nerea. Guipúzcoa, 2001. pp. 103.



Lucía Bosch Rubio recibió el título de Historiadora del Arte por la Universidad de las Islas Baleares en 2011, y de Técnico Superior en Conservación y Restauración de Bienes Culturales en 2010 por la Escola Superior de Conservació i Restauració de Béns Culturals de Catalunya. Desde 2011 es miembro fundador del equipo técnico Restaura, Servicios de Conservación y Restauración. Actualmente cursando el Máster en

Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo Olavide.

Riesgo y Vulnerabilidad: Conocer para proteger

Julia Benítez Jiménez

Resumen— Con el paso del tiempo el concepto de conservación ha ido evolucionando, de forma que hoy día al hablar de conservación se piensa en el mantenimiento de la obra en condiciones óptimas a lo largo del tiempo. Para llevar a cabo esta tarea de conservación es necesario estudiar las obras del Patrimonio objeto de interés, y en este sentido, los estudios de riesgo y vulnerabilidad son una herramienta indispensable para conocer el estado de las obras y poder establecer medidas adecuadas para conservarlas.

Palabras Claves— Conservación, Patrimonio, Riesgos, SIG, Vulnerabilidad.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la UNESCO, el riesgo es una función que viene dada por la peligrosidad y la vulnerabilidad que presenta un edificio [1].

La peligrosidad está relacionada de forma directa con peligros de diversa índole, entre los que se incluyen aquellos derivados del medio ambiente, los peligros estructurales, problemas de calidad ambiental o relacionados con la actividad del hombre.

La vulnerabilidad por su parte señala aquellas obras que son más sensibles a distintos riesgos, presentando daños y problemas que otras obras no presentarían en ningún caso.

Combinando estos dos aspectos, se obtiene un conocimiento más profundo sobre las obras y su entorno, que permite establecer medidas de conservación preventiva así como prioridades a la hora de restaurar.

A continuación profundizaremos en distintos estudios donde el análisis de riesgos es fundamental para la conservación del Patrimonio Histórico.

2. CARMONA Y ESTEPA (SEVILLA)

En estas dos poblaciones, situadas en la provincia de Sevilla, se ha llevado a cabo un análisis de riesgos y vulnerabilidad siguiendo la metodología establecida por Emilio Galán Huertos [2].

En el análisis se llevó a cabo el estudio de las patologías presentes, su frecuencia, la evaluación del daño que pueden causar, su intensidad, así como el índice de vulnerabilidad (IV) del principal material de construcción.

Los resultados obtenidos establecieron que los monumentos de ambas poblaciones se encontraban en buen estado de conservación, a excepción de la Alcazaba y el Alcázar (Figura 1), que presentaban una vulnerabilidad media y alta respectivamente, asociada erosiones, contaminación, vandalismo e intervenciones [3].

En cuanto a los principales riesgos se determinó que eran los relacionados con problemas estático-estructurales por posibles deslizamientos.

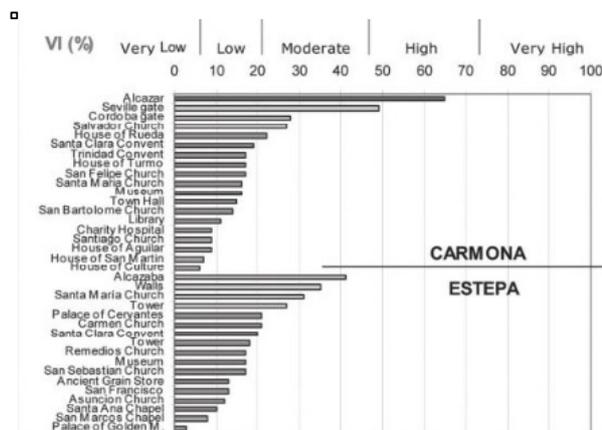


Fig. 1. Grado de vulnerabilidad de los monumentos estudiados. (Ortiz et al., 2013)

3. TAINAN (TAIWAN)

La ciudad de Tainan se encuentra situada en el suroeste de Taiwan, y en ella se realizaron mapas de riesgos climáticos para estudiar las posibles amenazas que genera el clima en los materiales de construcción que componen el Patrimonio Histórico [4].

Mediante la herramienta informática SIG (Sistemas de Información Geográfica) se elaboraron distintos mapas donde se reflejaban de forma individual parámetros y factores climáticos (Figura 2), la localización de los elementos patrimoniales objeto de estudio, y por último, las patologías causadas por el clima en los distintos materiales.

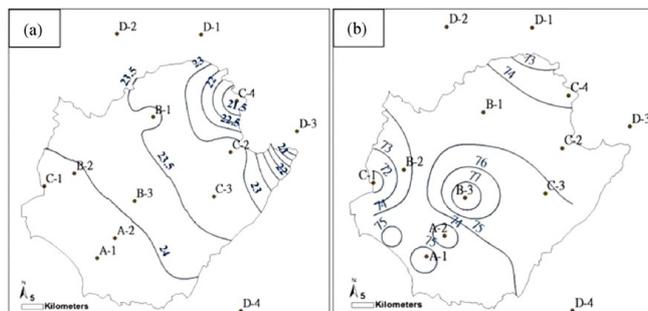


Fig.2.a) Promedio anual de temperatura (°C) y b) promedio anual de HR (%). (Ping-Sheng et al., 2014)

La información obtenida indica que los materiales pétreos presentan mayor riesgo de desgaste en las zonas costeras, mientras que los elementos de madera tienen, en las zonas urbanas, mayor riesgo de sufrir alteraciones cromáticas, grietas o ataques biológicos.

4. MÉRIDA (BADAJOS)

La ciudad de Mérida, en la provincia de Badajoz, cuenta con gran cantidad de edificaciones de época de su fundación, en tiempos del emperador Augusto [5].

Siguiendo la misma metodología que en el caso de Carmona y Estepa, una vez estudiados los peligros y la vulnerabilidad, se utiliza la herramienta SIG para realizar un mapa de riesgos donde quedan representadas las zonas con mayor peligro, y los monumentos que allí se emplazan.

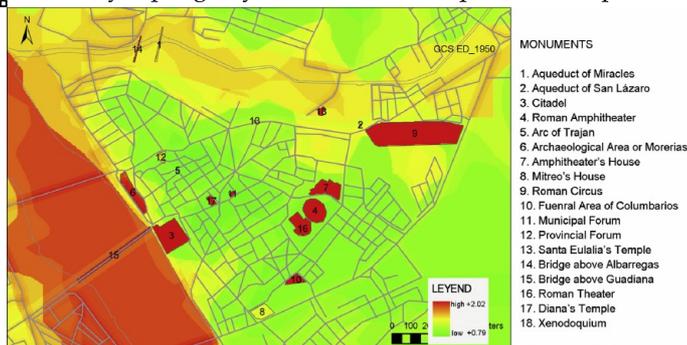


Fig. 3. Mapa de riesgos de la ciudad de Mérida. (Ortiz et al., 2014)

Según el estudio, los edificios presentan un buen estado de conservación, siendo las principales formas de alteración la pérdida de material, los depósitos superficiales, la erosión y la vegetación.

En cuanto a los mayores riesgos, estos provienen de la contaminación y la cercanía del río, ya que tanto las condiciones ambientales como la acción del hombre no son muy dañinos en este caso.

4. TURSI (ITALIA)

La ciudad de Tursi es un ejemplo de arquitectura vernácula que junto con Rabatan, una ciudadela medieval, conforma una de las piezas más importantes del patrimonio cultural de Basilicata en Italia [6].

En el estudio se han identificado aquellos edificios con algún tipo de valor histórico, artístico, etc., así como formas constructivas significativas y se ha recopilado información relacionada con el estado de conservación de las construcciones, materiales presentes y distintas mediciones.

Con esta información, mediante la asignación de valores numéricos a los daños encontrados y la utilización de SIG, se generaron mapas (Figura 4) donde se reflejaban las diferentes tipologías constructivas, el estado de conservación y el deterioro que presentaban los edificios.

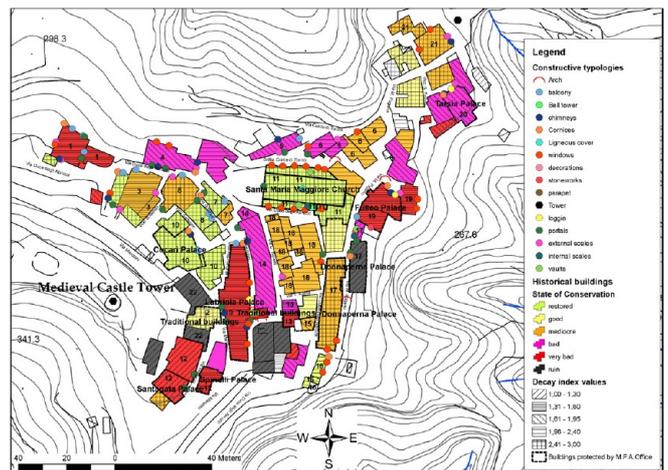


Fig.4. Estado de conservación, tipologías constructivas y deterioro en los edificios de Tursi. (Lazzari et al., 2009)

Con el estudio se estableció que la degradación presente era debida a los agentes climatológicos y a problemas estructurales.

Además, al comparar los resultados con los de la Monuments and Fine Arts Office de Basilicata se descubrió que algunos de los edificios en peor estado no se encontraban en su lista de protección.

5. VALPARAÍSO (CHILE)

La ciudad de Valparaíso fue declarada patrimonio de la humanidad por la UNESCO en el año 2003 y por su situación se encuentra expuesta a distintos riesgos, tanto naturales como humanos.

Debido a este motivo, en 2007 se inicia el Proyecto "MAR VASTO" para, entre otros objetivos, determinar el impacto causado por los principales riesgos como sismos, incendios, tsunamis o deslizamientos, y estudiar la vulnerabilidad de las 3 principales iglesias de la ciudad así como en la zona de Cerro Cordillera [7].

Para el estudio se recabaron datos sobre terremotos, inundaciones, incendios, etc., ocurridos en la ciudad a lo largo de su historia con los cuales se generaron mapas a través de SIG.

Los resultados desvelaban elevados riesgos de derrumbe en la zona urbana y de inundación en la línea costera, así como diversas zonas que presentaban una intensidad sísmica importante (Figura 5).

Por su parte, 2 de las 3 iglesias estudiadas presentan índices de daños por encima del 50%, con una alta probabilidad de colapso en caso de producirse un sismo o deslizamiento.

En Cerro Cordillera, a partir de planos, detalles de construcción y características del terreno se estudió la vulnerabilidad de la zona a los parámetros anteriormente mencionados (Figura 6).



Fig. 5. Ciudad de Valparaíso: Áreas de peligro y seguridad. (Indirli et al., 2010)

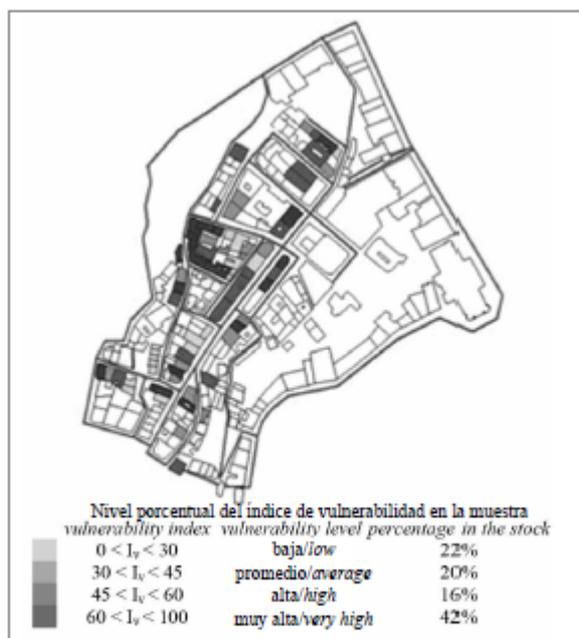


Fig. 6. Vulnerabilidad en Cerro Cordillera. (Indirli et al., 2010)

6. CONCLUSIONES

El análisis de riesgos y vulnerabilidad suponen un gran paso adelante en el estudio del Patrimonio Histórico, ya que de una forma sencilla y con bajos costes, permite conocer aquellos elementos del patrimonio que se encuentran en peores condiciones teniendo en cuenta las características de su entorno, y como éstas pueden influir en ellos.

La utilización de los Sistemas de Información Geográfica solo hace mejorar la viabilidad de estos análisis, por posibilitar la visualización de gran cantidad de información y datos de forma clara y concisa, permitiendo priorizar actuaciones que ayuden a la conservación del Patrimonio Histórico.

REFERENCIAS

- [1] HERRAEZ, J.A., MARTÍN RAMIREZ, J.M., ORTIZ CALDERÓN, P., ORTIZ CALDERÓN, R. (2014-2015): “Conservación Preventiva

VS Riesgos y Vulnerabilidad” en Máster de Diagnóstico en el Estado de Conservación del Patrimonio Histórico, Universidad Pablo de Olavide, 1-5.

- [2] GALÁN HUERTOS, E., BERNABÉ GONZALEZ, J., ÁVILA RUIZ, R.M. (2006): “La Aplicación de la evaluación de impacto ambiental en el Patrimonio Monumental y el desarrollo sostenible de las ciudades”, Revista de Enseñanza Universitaria, pp 123-140.
- [3] ORTIZ CALDERÓN, R., ORTIZ CALDERÓN P., MARTÍN RAMIREZ, J.M., DOMINGUEZ, A. (2013): “Risk analysis in Historical cities: The cases of Carmona and Estepa (Seville, Spain)”, Science and Technology for the Conservation of Cultural Heritage. Taylor & Francis Group, pp 379-382.
- [4] PING-SHENG, W., CHUN-MING, H., MIN-FU, H., (2014): «Using heritage risk maps as an approach to estimating the threat to materials of traditional buildings in Tainan (Taiwan)», Journal of Cultural Heritage, 15, pp 441-447.
- [5] ORTIZ CALDERÓN, P., ANTUNEZ, V., MARTÍN RAMIREZ, J.M., ORTIZ CALDERÓN R., VÁZQUEZ, M.A., GALÁN, E. (2014): «Approach to environmental risk analysis for the main monuments in a historical city», Journal of Cultural Heritage, 15, pp 432-440.
- [6] LAZZARI, M., DANESE, M., MASIMI, N. (2009): «A new GIS-based integrated approach to analyse the anthropic-geomorphological risk and recover the vernacular architecture», Journal of Cultural Heritage, 10 S, pp 104-111.
- [7] INDIRLI, M., SOTERO APABLAZA, M. (2010): «Protección del Patrimonio en Valparaíso (Chile): Proyecto “MAR VASTO”», Revista de Ingeniería de Construcción, 25, pp 21-62 <http://www.ricuc.cl/index.php/ric/index> [Consulta 10-05-2015]



Julia Benítez Jiménez recibió el título de Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla en Septiembre de 2012.

Actualmente se encuentra finalizando el Máster en Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla y está realizando una estancia en el Instituto Andaluz de Patrimonio Histórico en el Monasterio de Sta. Maria de las Cuevas en Sevilla.

CARACTERIZACIÓN DE LA CORROSIÓN DEL EDIFICIO METÁLICO DE BADAJOZ (ANTIGUO MERCADO DE ABASTOS) POR LAS TÉCNICAS SEM-EDX Y XRD

Manuel Alfaro-Domínguez; Ignacio Herrera-Navarro

Resumen— La estructura metálica del Edificio Metálico de Badajoz (Antiguo Mercado de Abastos) fue objeto de un diagnóstico de su conservación y restauración en el número 11 (septiembre de 2013, en la sección de patrimonio) de la presente publicación. La estructura metálica presenta corrosión medio ambiental y necesita de su restauración, para ello es necesario realizar previamente la caracterización de la corrosión metálica por diferentes técnicas de caracterización SEM-EDX (Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) y XRD (X-Ray Diffraction) que nos permitan determinar el estado y grado de la corrosión metálica que presenta la citada estructura a través de la composición química del material metálico.

Palabras Claves— Caracterización, Corrosión, Edificio, Metálico, SEM-EDX, XRD.

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente trabajo es realizar una caracterización del estado de corrosión metálica que presenta el Edificio Metálico de Badajoz (Antiguo Mercado de Abastos) y proponer su conservación y/o restauración para protegerla de la corrosión medioambiental, pues el citado Edificio Metálico de Badajoz está declarado Bien de Interés Cultural con la categoría de Monumento, por Decreto 251/2012, de 18 de diciembre, de la Junta de Extremadura [1] y publicado en el BOE el 29 de enero de 2013 [2]. Para ello se han realizado análisis por diferentes técnicas de caracterización SEM-EDX (Scanning Electron Microscopy-Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy) y XRD (X-Ray Diffraction) que nos permitan determinar el estado y grado de la corrosión metálica que presenta el mismo a través de la composición química del material metálico analizado.

1.1. Mecanismo de la corrosión metálica

La corrosión electroquímica de los metales, también llamada corrosión húmeda, se produce cuando el metal se halla en contacto con electrolitos entendiéndose por tales, medios ionizados (agua, soluciones salinas, ácidos, bases, etc.).

Cuando el metal se introduce en un electrolito, pasan en función de la tensión de disolución, iones positivos del metal hacia el electrolito, a la vez que iones positivos del metal, existentes en el electrolito tienden a depositarse en el metal. Esto ocurre hasta que la concentración de iones del metal en este medio alcanza un valor en el que se establece un equilibrio entre los dos movimientos. Si por algún procedimiento se van eliminando los iones existen-

tes en el electrolito, la disolución del metal en él continuará en tanto exista metal o electrolito, salvo que por alguna razón se proteja al metal. La intensidad o velocidad de ataque, depende de varios factores, entre ellos, de la concentración de iones negativos (aniones) en el electrolito, así como de las posibles capas protectoras que, como consecuencia del fenómeno, se formen en los ánodos.

2. MATERIAL Y ANÁLISIS REALIZADOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

2.1. Material analizado

He procedido a la obtención de una muestra metálica (que estaba desprendida), de la pilastra exterior del Edificio Metálico de Badajoz, que se observa en la Fotografía 1. Vista de la pilastra de obtención de la muestra metálica.



Fotografía. 1. Vista de la pilastra de obtención de la muestra metálica.

De la observación de visu, se desprende que la muestra metálica, de hierro fundido de dimensiones de 7 cm de un vértice a otro y de 6 mm de espesor presenta una corrosión electroquímica medio ambiental, bastante acentuada y generalizada por efecto de disolución de oxígeno at-

mósférico en el agua que es mayor en la cara externa que en la cara interna como se desprende de la observación, por estar expuesta la cara externa a una acción más intensa del agua del medio ambiente. En la cara externa se presenta descascarillamiento de gran parte de la masa superficial en la cual se han formado gran cantidad de óxidos e hidróxidos de hierro y otros compuestos químicos por efecto de la corrosión electroquímica que he identificado por las técnicas de caracterización siguientes SEM-EDX (Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) y XRD (X-Ray Diffraction).

Todas las pilastras de la estructura metálica exterior del Edificio Metálico de Badajoz, presentan corrosión electroquímica, unas pilastras presentan corrosión generalizada y otras, corrosión localizada en distintos puntos de las mismas sobre todo en su base.

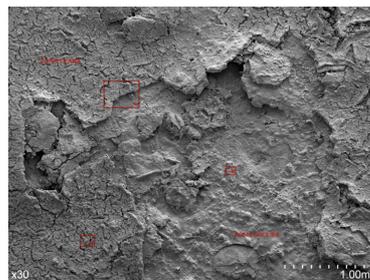
De la observación de visu de la muestra metálica, se podría deducir que la muestra metálica debido a sus tonos de color marrón-rojizo, ocre-amarillo, color negro y color gris-rojizo en distintos puntos de la muestra, podría contener óxidos e hidróxidos de hierro [3], lo cual se ha confirmado y determinado por las técnicas de caracterización citadas anteriormente y que a continuación expondré.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

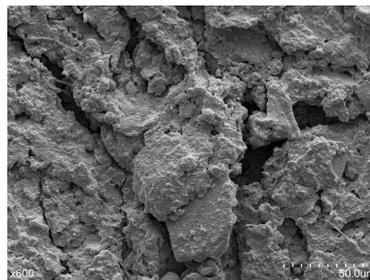
3.1. Resultados y discusión de la composición química por la técnica SEM-EDX

De la muestra metálica, se han realizado fotomicrografías a diferentes aumentos (30x, 200x, 250x, 300x y 600x) con la técnica SEM. En la Fotografía 2. Fotomicrografía zonas clara y oscura, se aprecia la fotomicrografía correspondiente a las zonas clara y oscura a 30 aumentos, en la Fotografía 3. Fotomicrografía zona clara, se aprecia la fotomicrografía correspondiente a la zona oscura a 600 aumentos, y en la Fotografía 4. Fotomicrografía zona oscura, se aprecia la fotomicrografía correspondiente a la zona oscura a 600 aumentos, de las cuales se aprecia mayor grado de corrosión en la zona clara a 600 aumentos que en la zona oscura a 600 aumentos, lo cual se corrobora con los análisis realizados por la técnica EDX en cinco puntos diferentes en la zona clara (mayor corrosión con mayor contenido de O) como se observa en la Tabla 1a. Análisis de los elementos químicos identificados por la técnica EDX (puntos de la zona clara) y en cinco puntos diferentes en la zona oscura (menor corrosión con menor contenido de O) como se observa en la Tabla 1b. Análisis de los elementos químicos identificados por la técnica EDX (puntos de la zona oscura).

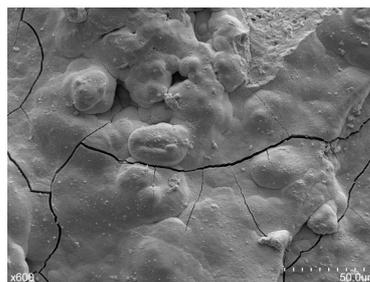
Comparando los resultados de las Tablas 1a y 1b se observa que el valor medio aritmético del % en peso de O es mayor en la zona clara (65,33 %) que en la zona oscura (56,68 %) y que además los valores del % en peso de O en todos los cinco puntos de la zona clara analizados son mayores que los correspondientes en los cinco puntos de la zona oscura analizados.



Fotografía. 2. Fotomicrografía zonas clara y oscura.



Fotografía. 3. Fotomicrografía zona clara.



Fotografía. 4. Fotomicrografía zona oscura.

De los resultados tanto de las fotomicrografías realizadas por la técnica SEM, como de los resultados obtenidos por la técnica EDX se desprende que en las zonas claras existe un mayor grado de corrosión por existir mayor contenido atómico del elemento químico O. También se deduce que el **material es una fundición** puesto que presenta un contenido de C en % en ambas zonas superior al 2,11 % de C de acuerdo con el Diagrama Hierro-Carbono (7,91 % de C media aritmética de los cinco puntos en zona clara y 3,36 % de C media aritmética de los cinco puntos en zona oscura).

Por otra parte, en todos los cinco puntos de la zona clara analizados existe mayor contenido de O en % que en los cinco puntos de la zona oscura analizados. La **fundición aleada** es aquella cuyo contenido en silicio o manganeso es superior al 5 % y 1,5 % respectivamente, o que contiene otros elementos, en proporciones superiores al 0,3 % (Ni, Cr, Co) o al 0,1 % (Ti, V, Mo o Al).

TABLA 1a
ANÁLISIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS
POR LA TÉCNICA EDX
(puntos de la zona clara)

Elemento químico	P 1 % (peso)	P 2 % (peso)	P 3 % (peso)	P 4 % (peso)	P 5 % (peso)	Media % (peso)
O	65,32	65,20	66,90	64,69	64,32	65,33
Fe	11,66	13,49	10,11	14,13	10,80	12,04
C	5,38	8,91	8,15	4,33	12,80	7,91
Al	3,57	2,97	1,99	5,57	2,30	3,28
Ca	2,90	2,40	3,21	2,27	2,40	2,64
Si	3,26	2,23	2,17	3,31	2,15	2,62
S	2,70	1,87	3,02	1,23	1,57	2,08
P	1,90	0,62	1,55	0,68	1,03	1,16
Mg	1,16	0,80	0,81	1,66	0,78	1,04
Na	1,43	0,76	1,19	1,37	1,30	1,21
Cl	0,36	0,38	0,44	0,44	0,17	0,37
K	0,36	0,37	0,44	0,30	0,38	0,37
Zn						
Mn						
Ttal	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

TABLA 1b
ANÁLISIS DE ELEMENTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS
POR LA TÉCNICA EDX
(puntos de la zona oscura)

Elemento químico	P 1 % (peso)	P 2 % (peso)	P 3 % (peso)	P 4 % (peso)	P 5 % (peso)	Media % (peso)
O	61,95	56,38	54,56	61,73	48,79	56,68
Fe	24,00	31,18	34,43	22,60	31,66	28,77
C	3,28	3,33	2,52	3,48	4,21	3,36
Al	0,44	0,59	0,30	1,43	1,00	0,75
Ca	3,28	2,73	3,47	2,31	2,92	2,94
Si	1,07	2,40	1,51	3,38	5,32	2,74
S	0,44	0,45	0,39	1,32	2,41	1,00
P	0,12	0,46	0,04	1,26	0,63	0,50
Mg	1,12	1,19	0,80	0,92	0,90	0,99
Na						
Cl	0,16	0,20	0,25	0,36	0,37	0,27
K	0,14	0,14	0,26	0,44	0,16	0,23
Zn	0,73	1,00	1,01	0,46	0,17	0,67
Mn	0,75	0,46	0,47	0,33	1,45	0,69
Ttal	100	100	100	100	100	100

TABLA 2a
ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE LOS COMPUESTOS
QUÍMICOS IDENTIFICADOS POR XRD CON BARRIDO
ACOPLADO (en el espesor de la muestra)

XRD con barrido acoplado			
Compuesto	Fórmula	Sistema cristalino	(%)
Hierro-Cromo	Fe-Cr	Cúbico	74,2
Óxido de Cromo	CrO _{1,01}	Cúbico	15,8
Hierro, syn	Fe	Cúbico	8,4
Hematita, syn	Fe ₂ O ₃	Romboédrico	1,6

De acuerdo con esto, el **material es una fundición aleada**, puesto que presenta elementos químicos como por ejemplo Al en % superior al 0,1 % tanto en el valor medio aritmético de los cinco puntos de la zona clara (3,28 %) como en el valor medio aritmético de los cinco puntos de la zona oscura (0,75 %), así como Cr que aunque no se detecta por la técnica EDX por ser esta una técnica de análisis superficial,

TABLA 2b
ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE LOS COMPUESTOS
QUÍMICOS IDENTIFICADOS POR XRD CON BARRIDO
DE INCIDENCIA RASANTE (en la superficie de la muestra)

XRD con barrido de incidencia rasante			
Compuesto	Fórmula	Sistema cristalino	(%)
Hematita, syn	Fe ₂ O ₃	Romboédrico	77,8
Goethita	Fe ₃ O(OH)	Ortorrómbico	12,3
Hidróxido-Carbonato de Hierro	Fe ₂ (OH) ₂ (CO ₃)	Romboédrico	3,9
Ferosyhyta, syn	FeOOH	Hexagonal	2,4
Wustita, syn	Fe _{0,902} O	Cúbico	1,6
Lepidocrocita	FeOOH	Ortorrómbico	1,2
Óxido de Cromo	CrO	Cúbico	0,8

sin embargo como veremos posteriormente se detecta tanto por la técnica de Difracción de Rayos X con barrido acoplado (donde el Cr está como CrO_m con un 15,8 %, porque es en las capas más profundas del material) como por Difracción de Rayos X con incidencia rasante (donde el Cr está presente como CrO con un 0,8 % porque es en la capa superficial del material pero en un análisis de más profundidad superficial que por la técnica EDX) como se observará en las Tablas 2a y 2b. Análisis semicuantitativo de los compuestos indentificados por la técnica XRD. También el material presenta Si pero en una cantidad inferior al 5 % tanto en el valor medio aritmético de los cinco puntos de la zona clara (2,62 %) como en el valor medio aritmético de los cinco puntos de la zona oscura (2,74 %) debido seguramente a una pérdida de concentración por la corrosión metálica superficial ya que en la zona clara (de mayor corrosión) es ligeramente menor que en la zona oscura (de menor corrosión). Por último, también presenta el material Mn, pero en una cantidad inferior al 1,5 % y además sólo presentan Mn los puntos de la zona oscura (de menor corrosión, uno de ellos en concreto 1,45 %), mientras que los puntos de la zona clara no presentan ninguno de los cinco puntos ningún porcentaje de Mn debido seguramente como en el caso del Si a una pérdida de concentración por la corrosión metálica superficial. Con respecto al contenido de C es mayor en la zona clara con valor medio aritmético de 7,91 % que en la zona oscura con valor medio aritmético de 3,36 % debido a que en la zona clara de mayor corrosión está presente el C en forma de un compuesto químico que es el Hidróxido-Carbonato de Hierro, $\text{Fe}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)$, el cual está presente con un 3,9 % (Tabla 2b. Análisis semicuantitativo de los compuestos indentificados por la técnica XRD con barrido de incidencia rasante), de aquí la contribución de este compuesto al aumento del % de C en la zona clara por efecto de la corrosión ambiental (combinación con el CO_2 atmosférico). Con respecto al Fe existe mayor cantidad en la zona oscura (28,77 % valor medio aritmético de los cinco puntos) que en la zona clara (12,04 % valor medio aritmético de los cinco puntos) puesto que la zona oscura es la de menor grado de corrosión y existe más Fe, como se corrobora por el análisis realizado por la técnica de Difracción de Rayos X con barrido acoplado (Tabla 2a) ya que en el interior del material el Fe está presente como Hierro-Cromo, con un 74,2 % y también como Hematita syn, Fe_2O_3 , con un 1,6 %, éste último proveniente de la oxidación de las capas más profundas de la superficie del material.

3.2. Resultados y discusión de la composición química por la técnica XRD

En las Tablas 2a y 2b. Análisis semicuantitativo de los compuestos químicos identificados por la técnica XRD, se muestran los resultados del análisis semicuantitativo de los compuestos químicos identificados en la muestra metálica por Difracción de Rayos X con barrido acoplado y por Difracción de Rayos X con barrido de incidencia rasante respectivamente.

De los resultados expuestos en las Tablas 2a y 2b, se desprende que la muestra ha sufrido una corrosión bas-

tante elevada tanto en la superficie como en el interior de la misma, siendo obviamente mayor en la superficie que en el interior por estar más expuesta la superficie a la acción de la corrosión medio ambiental por efecto del oxígeno atmosférico disuelto en el agua, así como del dióxido de carbono atmosférico y que puede disolverse en el agua. En el interior de la muestra metálica se ha formado, Óxido de Cromo, CrO_m , presente en un 15,8 % debido a la reacción del oxígeno atmosférico disuelto en el agua con el Cr presente en la fundición, así como Hematita syn, Fe_2O_3 , presente en un 1,6 % debido a la reacción también del oxígeno atmosférico disuelto en el agua con el Fe de la fundición, siendo el porcentaje total de estos dos óxidos del 17,4 %.

4. CONCLUSIONES

Como hemos visto toda la superficie de la muestra metálica de la fundición analizada presenta corrosión con distintos tipos de óxidos e hidróxidos de hierro e incluso hidróxido-carbonato de hierro y óxido de cromo, por tanto la corrosión a nivel superficial ha sido total. En cambio en el interior de la muestra metálica de la fundición analizada, la corrosión se ha visto frenada por la formación del óxido de cromo, CrO_m , siendo sin embargo, también bastante elevada, puesto que este óxido de cromo está presente con un 15,8 % y además se ha formado también un óxido de hierro, Hematita syn, Fe_2O_3 , con un 1,6 %, por tanto, el total de los óxidos formados en el interior de la muestra metálica analizada es de 17,4 %, lo cual representa un porcentaje elevado del total de compuestos químicos que se detectan por la técnica de Difracción de Rayos X.

De esta caracterización de la corrosión del Edificio Metálico de Badajoz (antiguo mercado de abastos) se desprende que es urgente la restauración y conservación de la estructura metálica del citado edificio.

REFERENCIAS

- [1] Resolución de 2 de mayo de 2012, de la Consejería de Cultura de la Junta de Extremadura. Incoacción de Expediente de Declaración de Bien de Interés Cultural con la categoría de Monumento para el Edificio Metálico (antiguo mercado de abastos) de Badajoz. DOE (Diario Oficial de Extremadura) N° 104 de 31 de mayo de 2012.
- [2] Decreto 251/2012, de 18 de diciembre, por el que se declara el Edificio Metálico (antiguo mercado de abastos) en el término municipal de Badajoz como Bien de Interés Cultural con la categoría de Monumento. DOE (Diario Oficial de Extremadura) N° 247 de 24 de diciembre de 2012.
- [3] M. Alfaro Domínguez, "Diagnóstico de la conservación y restauración del edificio metálico de Badajoz (antiguo mercado de abastos)", *Revista de Química de la Universidad Pablo de Olavide* n° 11, Sept 2013, <http://www.upo.es/moleqla/index.jsp>

El Selank, más que un ansiolítico

Francisco José Paniagua Balbuena

Resumen—El Selank es un péptido sintético análogo del inmunomodulador tuftsina que ha despertado un gran interés como ansiolítico por carecer de los efectos secundarios típicos de estos medicamentos. A diferencia de la mayoría de estos se administra por vía intranasal y no actúa directamente sobre los neurotransmisores sino a nivel de las enzimas degradadoras de neuropéptidos.

Palabras Claves— Selank, péptido, ansiolítico, nootrópico, efectos secundarios.

1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos de ansiedad son sin ninguna duda una de las enfermedades más preocupantes en las sociedades desarrolladas, tanto por su elevada y creciente frecuencia como por su capacidad para alterar la vida de los pacientes y empeorar significativamente la calidad de esta. Según la *Anxiety and depression association of America* (ADAA) [1], la ansiedad es el desorden mental más frecuente en los Estados Unidos, afectando a un sorprendente 18 % de la población adulta, lo que en cifras absolutas se traduce en un coste humano de 40 millones de personas afectadas y económico de 42 billones de dólares anuales.

No es de extrañar por tanto que la industria farmacéutica venga haciendo un gran esfuerzo en la búsqueda de nuevos fármacos para hacer frente a esta afección. La mayoría de ellos actúa sobre los receptores o los sistemas de recaptación de distintos neurotransmisores, fundamentalmente GABA y serotonina [2]. Estos neurotransmisores están implicados en los mecanismos ansiogénicos, pero también en muchos otros procesos cognitivos y conductuales. Como consecuencia la alteración de su fisiología suele tener numerosos efectos adversos, que van desde la somnolencia y miorelajación hasta la adicción.

Es por ello que en los últimos años los análogos de péptidos reguladores han despertado un gran interés, dados los reducidos efectos secundarios que algunos de ellos presentan. Tal es el caso del Selank.

2. DESCUBRIMIENTO

El descubrimiento del Selank y de su potencial actividad farmacológica está ligado, como por otra parte es lógico, al péptido del que es análogo: la tuftsina. Se trata de un tetrapéptido de secuencia: Thr-Lys-Pro-Arg que se encuentra en la fracción cristalizante de la cadena pesada de la inmunoglobulina G [3].

Para poder ser activado, este péptido debe ser proteolizado y separado del resto de la inmunoglobulina por acción de enzimas específicas. Dado su origen, no es de extrañar que su actividad sea fundamentalmente inmunológica

(activa a algunas células que presentan receptores de inmunoglobulina G, fundamentalmente neutrófilos, macrófagos y linfocitos NK).

No fue hasta 1980 cuando la semejanza entre este péptido y algunos motivos de los neuropéptidos sustancia P y neurotensina [4] llevó a estudiar su actividad sobre el sistema nervioso central. Se encontró, tanto en el citado estudio como en otros posteriores, que la tuftsina provocaba una disminución en la percepción del estrés atribuida al descenso en los niveles y en la sensibilidad neuronal a las catecolaminas.

A priori esta actividad lo convierte en un candidato perfecto para tratar los trastornos de ansiedad. No obstante, este tipo de péptidos son rápidamente degradados tras ser suministrados. Es por ello que para poder emplear la actividad ansiolítica de la tuftsina, fue necesario añadir una cola de Pro-Gly-Pro en el extremo C-terminal que estabiliza el péptido y lo hace menos sensible a las proteasas. El heptapeptido resultante, conocido como Selank, perdía gran parte de la capacidad de su análogo endógeno para modular la respuesta inmune (aunque conserva cierta capacidad antiviral atribuida a los cambios en la síntesis de citoquinas [11]), pero a cambio se convertía en un ansiolítico potente y estable.

3. SÍNTESIS

Pese al reciente apogeo de la síntesis de péptidos en fase sólida, el grupo que desarrolló el Selank optó por una estrategia de síntesis en fase líquida [5], probablemente por su mayor economía y facilidad de escalado en procesos industriales [6].

El proceso comienza con la condensación de la prolina y la glicina del extremo C-terminal del Selank. Para ello, además de la prolina protegida con un tertbutoxicarbonil (Boc) unido a su grupo amino y la glicina, se emplean otros tres reactivos: Cloruro de pivaloilo (PivCl), trietilamina (TEA) y acetatonitrilo.

El PivCl y la TEA se añaden a la prolina protegida antes de adicionar los otros dos reactivos (glicina y acetatonitrilo). El empleo de PivCl tiene como objetivo activar el grupo carboxilo de la prolina convirtiéndolo en un anhídrido y posterior haluro de acilo [7] como se aprecia en la figura 1.

Por su parte la TEA cumple varias funciones. La fundamental consiste en secuestrar el cloro que se libera en la reacción de acoplamiento entre la prolina activada (halogenada) y la glicina. Con ello se retira cloro del medio acelerando la reacción y además se previene la formación de la sal hidrociorada de la glicina, que la inhabilitaría para el ataque nucleófilo a la prolina [8]. Por otro lado la TEA es una base orgánica fuerte que mantiene alto el pH del medio, evitando que pudieran darse las condiciones de acidez

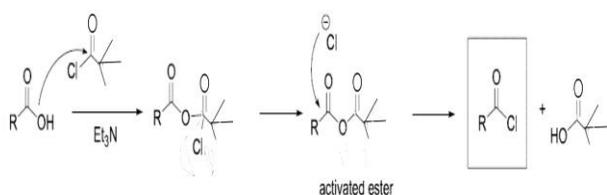


Fig. 1. Mecanismo de activación del grupo carboxilo de la prolina. Modificada de [8].

que provocarían la desprotección del grupo amino de la prolina [9].

El acetronitrilo por su parte actúa como disolvente orgánico, que evita la racemización de los aminoácidos que puede ocurrir tanto por la vía de la oxazol-5(4H)-ona (figura 2) como por abstracción directa de un protón en medio básico (figura 3) [10]. Dado que ambos mecanismos requieren un medio polar que permita el intercambio de protones, el uso de un disolvente apolar como el acetronitrilo evita que tengan lugar.

Tras un paso de purificación (que se repite tras la adición de cada aminoácido) por extracción del bipéptido desde una fase acuosa ácida (preparada tras la evaporación de la mezcla de reacción) a una fase de acetato de etilo, se procede a añadir, junto con los componentes de la mezcla de reacción arriba detallados, una segunda prolina protegida, esta vez en el extremo carboxilo mediante un bencilo (Bzl).

A continuación se procede a desproteger el extremo amino del dipéptido mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético. Seguidamente se añade el siguiente aminoácido (en este caso arginina), protegido con un ester terbútilico en su extremo amino terminal y activado por adición de diclohexilcarbodiimida en el extremo carboxilo.

El resto de la cadena se obtiene de forma análoga, repitiendo sucesivos ciclos de purificación y desprotección del péptido y adición del aminoácido correspondiente protegido en el amino terminal (y sin olvidar la mezcla de reacción). En todo caso puede variar la naturaleza del disolvente o del activador empleado en función del aminoácido añadido en cada etapa del proceso.

3. FARMACOCINÉTICA

La naturaleza peptídica del Selank y su consecuente sensibilidad a las peptidasas limita enormemente sus posibles

vías de administración. Como consecuencia de dicha actividad el Selank es fragmentado fundamentalmente en 4 péptidos menores, que posteriormente serán degradados hasta aminoácidos libres. Estos péptidos son: Thr- Lys-Pro-Arg-Pro, Thr- Lys-Pro, Arg-Pro, Gly-Pro. Entre ellos los más destacables son los dipéptidos citados en último lu-

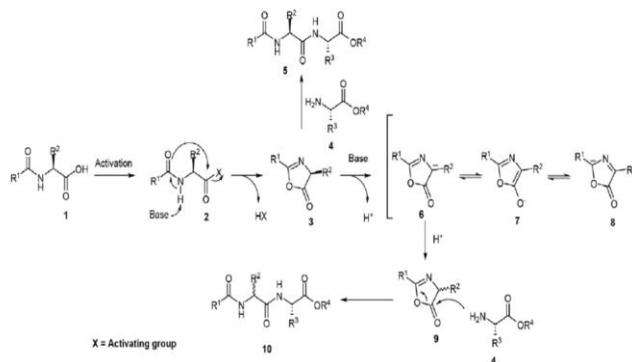


Fig. 2. Racemización de los aminoácidos de un péptido por la ruta de la oxazol-5(4H)-ona [10]

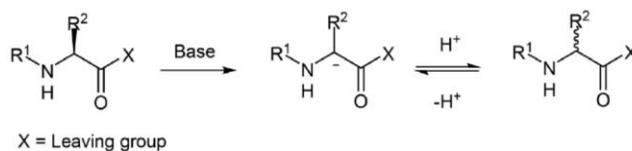


Fig. 3. Racemización de los aminoácidos de un péptido por abstracción directa de protones [10].

gar, pues presentan efectos similares o incluso de mayor intensidad que los del propio Selank [11].

Se han estudiado dos posibles vías de administración: peritoneal e intranasal, siendo esta última superior en todos los aspectos estudiados.

Esta última vía permite una elevada biodisponibilidad (del 92.8%) con un rápido acceso del fármaco al torrente sanguíneo (es detectado en este tras solo 30 segundos desde la administración) y al cerebro (al que alcanza en 2 minutos). Su degradación por parte de las proteasas del plasma sanguíneo es mucho menor que cuando se emplea la vía peritoneal, siendo suficientemente baja como para permitir su acumulación en el archicórtex y el diencéfalo, donde ejerce su función durante 12-24 h. Todo ello permite al Selank actuar eficazmente incluso a dosis bajas, comenzando su efecto de forma casi inmediata tras la administración y prolongándose durante un período suficiente de tiempo.

4. EFECTO DEL SELANK SOBRE EL SNC

Aunque el mecanismo de ansiólisis del Selank no se conoce en la actualidad con total claridad, parece ser que interviene en la regulación del sistema opioide. Se trata de 3 péptidos: encefalinas, dinorfinas y beta endorfinas, que actúan como neuromoduladores, modificando la excitabili-

dad de ciertas neuronas y afectando la liberación de neurotransmisores en neuronas presinápticas o la sensibilidad a los mismos en aquellas postsinápticas. Concretamente los neurotransmisores cuyas concentraciones se ven incrementadas tras la administración del Selank son la noradrenalina, la dopamina y la serotonina [11]. Esto se traduce en un incremento de la euforia y en un descenso en la tasa respiratoria, en la percepción del dolor y en las posibilidades de que ocurran alteraciones repentinas en la actividad eléctrica de las neuronas (ataques) [12].

No es de extrañar por tanto que dichos péptidos y sus receptores se postulen como posibles dianas para la lucha contra la ansiedad y por supuesto no lo es que el Selank actúe sobre tal sistema. Concretamente este péptido lleva a cabo la inhibición de la encefalina, lo cual lleva a un incremento comprobado de la vida media de las Leu-encefalinas [13], aunque se cree que este no es el único neuropéptido cuya vida media se ve incrementada debido a la inhibición de las actividades carboxipeptidasas y dipeptidilcarboxipeptidasas que el Selank lleva a cabo [11].

Puesto que el estrés y la ansiedad influyen negativamente en el pleno desarrollo de las capacidades cognitivas y en los procesos de aprendizaje, se estudia también el uso del Selank como nootrópico.

Actualmente existen discrepancias sobre qué medicamentos pueden adherirse a este término. La definición original hacía referencia a la capacidad del piracetam para mejorar las capacidades cognitivas sin provocar efectos secundarios, pero en la actualidad no hay consenso sobre si este último requisito es indispensable para que un fármaco pueda ser considerado nootrópico o si basta con que este produzca el mencionado incremento de las capacidades cognitivas [14].

En cualquier caso, incluso considerando el más exigente de los supuestos, el Selank cumple con las condiciones necesarias para ser considerado nootrópico, pues ha demostrado su capacidad para acelerar los procesos de aprendizaje en ratas [11]. Esto se atribuye fundamentalmente a la susodicha ansiólisis, pero también a un posible relacionado incremento en la síntesis de péptidos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) [15], involucrado en los procesos de aprendizaje y formación de interconexiones neuronales estables (engramas). No es descartable que haya otros neuropéptidos con influencia en las capacidades cognitivas cuya síntesis se vea incrementada al administrar Selank, y es que analizando con microarrays el cDNA de neuronas del hipocampo de ratas a las que se les había administrado Selank se han encontrado variaciones significativas en la expresión de más de 50 genes [16].

5. CONCLUSIÓN

Los efectos secundarios de somnolencia y adicción que los ansiolíticos de uso común presentan no solo son el mayor inconveniente para los pacientes que se ven, por su condición, obligados a consumirlos, sino también aquello que

genera más reticencias a la hora de prescribirlos y consumirlos.

La comercialización de nuevos ansiolíticos y nootrópicos que mimetizan péptidos endógenos y que carecen de efectos secundarios (caso del Selank, pero también del Semax por ejemplo [11]) sin duda mejorará la calidad de vida de los pacientes, pero también plantea interrogantes sobre la utilización indiscriminada de estos fármacos que no solo pueden hacernos más felices y menos estresados, sino también mejorar nuestra memoria, ingenio o creatividad. Sin la consciencia de un retorno negativo para la salud y la consecuente conciencia de igual carácter, ¿qué nos impide incorporar estos fármacos a nuestra dieta habitual? ¿Debe por el contrario regularse su uso atendiendo al principio de precaución y al posible surgimiento de efectos adversos a largo plazo? Son sin lugar a dudas cuestiones a las que nuestra sociedad tendrá que enfrentarse conforme nuevos fármacos con las características del Selank vayan viendo la luz.

REFERENCIAS

- [1] *Anxiety and Depression Association of America*. Facts and Statistics. <http://www.adaa.org/about-adaa/press-room/facts-statistics>
- [2] G. Griebel and A. Holmes, "50 Years of Hurdles and Hope in Anxiolytic Drug Discovery," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, no. 9, pp. 667–687, 2013.
- [3] M. Fridkin and V. Najjar, "Tuftsin: Its Chemistry, Biology, and Clinical Potentia," ... *Biochem. Mol. Biol.*, vol. 9238, no. December, pp. 0–40, 1989.
- [4] A. V. Val'dman, M. M. Kozlovskaya, I. P. Ashmarin, M. F. Mineeva, and K. V. Anokhin, "Central effects of the tetrapeptide tuftsin," *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 92, no. 1, pp. 890–892, Jul. 1981
- [5] V. P. Shevchenko, I. Y. Nagaev, L. Y. Alfeeva, L. A. Andreeva, K. V. Shevchenko, and N. F. Myasoedov, "Synthesis of tritium-labeled Selank," *Radiochemistry*, vol. 48, no. 3, pp. 296–300, 2006.
- [6] S. Chandrudu, P. Simerska, and I. Toth, "Chemical Methods for Peptide and Protein Production," *Molecules*, vol. 18, no. 4, pp. 4373–4388, 2013.
- [7] K. V. S. R. G. Prasad, K. Bharathi, and B. Haseena Banu, "Applications of peptide coupling reagents - An update," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 108–119, 2011.
- [8] C. a G. N. Montalbetti and V. Falque, "Amide bond formation and peptide coupling," *Tetrahedron*, vol. 61, no. 46, pp. 10827–10852, 2005.
- [9] G. Tojo and M. I. Fernandez, *Oxidation of Primary Alcohols to Carboxylic Acids: A Guide to Current Common Practice*. Springer, p. 17, 2007.
- [10] Y. Yang, "Peptide Racemization," in *Side Reactions in Peptide Synthesis*, Elsevier, 2016, pp. 257–292.
- [11] T. Kolomin, M. Shadrina, P. Slominsky, S. Limborska, and N. Myasoedov, "A New Generation of Drugs: Synthetic Peptides Based on Natural Regulatory Peptides," *Neurosci. Med.*, vol. 04, no. 04, pp. 223–252, 2013.
- [12] J. C. Froehlich, "Opioid peptides," *Alcohol Health Res. World*, vol. 21, no. 2, pp. 132–6, 1997.

- [13] O. Y. Sokolov, V. K. Meshavkin, N. V Kost, and A. A. Zozulya, "Effects of Selank on behavioral reactions and activities of plasma enkephalin-degrading enzymes in mice with different phenotypes of emotional and stress reactions.," *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 133, no. 2, pp. 133–5, Feb. 2002.
- [14] D. Boison and S. A. Masino, *Homeostatic Control of Brain Function*. Oxford University Press, 2015.
- [15] L. S. Inozemtseva, E. A. Karpenko, O. V. Dolotov, N. G. Levitskaya, A. A. Kamensky, L. A. Andreeva, and I. A. Grivennikov, "Intranasal administration of the peptide Selank regulates BDNF expression in the rat hippocampus in vivo," *Dokl. Biol. Sci.*, vol. 421, no. 1, pp. 241–243, Aug. 2008.
- [16] T. A. Kolomin, M. I. Shadrina, Y. V. Agniullin, S. I. Shram, P. A. Slominskii, S. A. Limborska, and N. F. Myasoedov, "Transcriptomic response of rat hippocampus and spleen cells to single and chronic administration of the peptide selank," *Dokl. Biochem. Biophys.*, vol. 430, no. 1, pp. 5–6, Feb. 2010.



Francisco José Paniagua Balbuena estudia el tercer año del grado en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide.

Diseño racional de fármacos en el tratamiento de las úlceras gástricas.

María Expósito Serrano

Resumen—En este artículo se muestra una visión general sobre la gama de fármacos utilizados en el tratamiento de úlceras gástricas y duodenales y el reflujo gastroesofágico, así como una visión sobre la evolución en el ámbito farmacológico y del diseño de fármacos de este tipo en las últimas décadas.

Palabras Claves—Antiinflamatorios no esteroideos (AINES), Cimetidina, Histimina, Inhibidores de la bomba de protones (IPP), Optimización, Receptores-H2, SAR, Tratamientos, Úlceras.



1. INTRODUCCIÓN

Las personas, a diferencia del resto de organismos vivos, somos seres racionales que nos hacemos preguntas sobre el entorno que nos rodea, nos ponemos objetivos o metas que cumplir, buscamos soluciones racionales a los problemas, tenemos sentimientos...pero, una de las mayores preocupaciones que pasan por la cabeza del ser humano es la salud. Conforme pasa el tiempo, nos hacemos mayores, cada vez somos más propensos a padecer enfermedades, como problemas óseos, pérdida de visión, infartos... Entre estos problemas encontramos las úlceras, caracterizadas por la presencia de una lesión profunda en la membrana o mucosa del estómago o duodeno. La úlcera puede conllevar hemorragias digestivas o perforación a la cavidad peritoneal. Entre las causas externas que la producen encontramos la ingesta de antiinflamatorios no esteroideos (AINES)/Aspirina y la bacteria *Helicobacter pylori*, principalmente. En el desarrollo de la úlcera, tiene un papel importante la secreción ácida y el jugo gástrico, por lo que un posible tratamiento sería evitar la secreción de ácido gástrico. [1]

En cuanto al tratamiento médico actual, se emplean variedad de medicamentos, como los llamados antiácidos (hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio) para el alivio del dolor, agentes protectores de la mucosa (sucralfato), prostaglandinas sintéticas (enprostil y misoprostol) en la prevención de úlceras desarrolladas a partir de AINES, inhibidores de la bomba de protones (PPI) como el omeprazol, lansoprazol... que son potentes antisecretores de ácido, o los antagonistas de los receptores H2 (cimetidina, ranitidina o famotidina) que inhiben la secreción ácida. En el caso de que aparezcan complicaciones, como hemorragias, perforación... se contempla el tratamiento quirúrgico. En úlceras producidas por infección bacteriana, es habitual el uso de antibióticos como la amoxicilina, claritromicina y metronidazol para su tratamiento. [2]

2. DESARROLLO DE LOS PRIMEROS TRATAMIENTOS EFECTIVOS.

2.1. Contexto.

En la década de los 60 aún se disponía de poca informa-

ción sobre esta dolencia, ni tampoco de tratamientos efectivos. No se conocían con exactitud las causas que la desencadenaban, pero sí se sabía que se agravaban con las propias secreciones gástricas. Por ello, en un principio el objetivo fue la neutralización de este ácido utilizando bases, como bicarbonato sódico. El problema era que se requería la administración de base en grandes cantidades, lo que conllevaba efectos secundarios. Hasta la fecha se sabía que la secreción gástrica por las células parietales del estómago se desencadenaba por la acción de acetilcolina, gastrina e histamina. Partiendo de esto, se contempló la posibilidad de inhibir los receptores de estas moléculas. Esto resultó ser un problema en el caso de los receptores de acetilcolina, pues desempeñan otras funciones de importancia en el organismo. [3] Entonces, algunos investigadores se centraron en la búsqueda de antagonistas de los receptores de histamina para reducir la secreción de ácido gástrico. En este sentido, se conocía la existencia de los receptores H1 de histamina, pero los antagonistas hasta el momento desarrollados no inhibían dicha secreción. Así que lo curioso es que los investigadores, debido a esta observación, supusieron que debía existir otro tipo de receptores de histamina implicados en la secreción gástrica, a los que se llamaría H2. A partir de este momento, se comenzó la búsqueda de antagonistas específicos de estos receptores para el tratamiento de las úlceras, los cuales debían inhibir la secreción de ácido gástrico. [4][5] Los investigadores se encontraron con que no conocían ningún antagonista de receptores H2, y de hecho, ni siquiera tenían certeza de la existencia este tipo de receptores. ¿Por dónde podían empezar para diseñar una molécula que se uniera al receptor H2 inhibiéndolo? La decisión fue tomar como punto de partida la propia histamina, un ligando natural del receptor hipotético y, a partir de ahí, hacer modificaciones con la intención de que se uniera al receptor como antagonista. [3]

2.2. Búsqueda de antagonistas-H2.

Primero se debía encontrar el farmacóforo de la histidina que permitía la unión al receptor H2, partiendo de la premisa del desconocimiento de la existencia del mismo. Para ello se hicieron estudios estructura-actividad (SAR)



Fig 1. SAR para agonistas del receptor H1 (izquierda) y del receptor H2 (derecha). [3]

ensayando si los análogos de histamina se unían al receptor H2. Para saber esto último se basaban en la secreción de ácido gástrico. De estos estudios, se concluyó que las

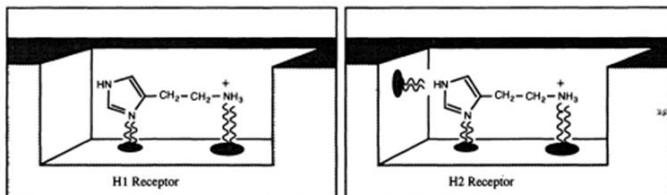


Fig 2. Interacción de los agonistas con los receptores H1 y H2. [3]

partes necesarias de la estructura de la molécula para la unión a H2 eran las mismas que para la unión al receptor H1, es decir, un átomo de N cargado positivamente en una cadena lateral con libertad de giro, unida a un anillo heteroaromático (con un átomo de nitrógeno en orto a la cadena lateral), pero en el caso de los ligando de H2, el anillo debía contener una unidad amidina (HN-CH-N:). (Figura 1).

Se concluye finalmente que el grupo amino α se une a ambos receptores por puentes de hidrógeno o enlaces iónicos, mientras que el átomo (o átomos en el caso de receptor H2) de nitrógeno del anillo heteroaromático se une por puentes de hidrógeno. (Figura 2).

Una vez conseguido el agonista, requerían conseguir el antagonista, haciendo que la molécula se una al receptor H2 impidiendo el cambio conformacional que permite su activación. Basándose en la experiencia adquirida en otras estrategias de modificación, se sabía que en muchas ocasiones la introducción de un grupo aromático grande transformaba un agonista en antagonista, pero esta técnica no dio resultado. Del mismo modo, se probó introduciendo sustituyentes hidrofóbicos, también sin éxito. Sin embargo, con esta última estrategia se encontró la 4-metilhistamina, que resultó ser un agonista de los dos receptores, pero con mayor selectividad por los receptores H2. Esto es así porque había mayor población de moléculas en la conformación más estable, que era la que se unía mejor a H2. A pesar de ello, no se dió con antagonistas.

Entonces se plantearon reemplazar el grupo αNH_3^+ por otros grupos funcionales polares que se unan al mismo sitio en el receptor, pero alterando la geometría del enlace, como una posibilidad para encontrar antagonistas. [3] Se llegó así a la N-guanilhistamina mediante la introduc-

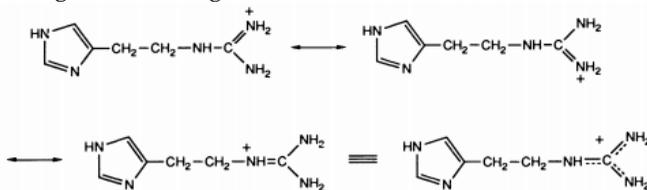


Fig 3. N-guanilhistamina. [3]

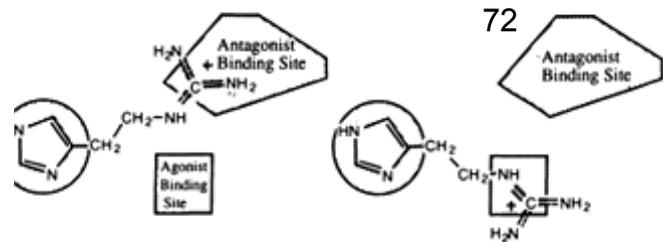


Fig 4. Posibles formas de unión de N-guanilhistamina (arriba) y unión de agonista histamina (abajo). [3]

ción de guanidina en la cadena lateral (Figura 3). Esta presentaba una débil propiedad como antagonista de la secreción gástrica, es agonista parcial, liberándose menos cantidad de ácido gástrico. [4] Además, se demostró que en esta actividad eran importantes tanto el anillo imidazol como el grupo guanidino. Se comparó la estructura de la histamina y la N-guanilhistamina, proponiendo que la N-guanilhistamina podía interactuar, además de con el sitio de interacción de activación del receptor, con otro sitio en el receptor al que no tenía acceso la histidina y que permitía la acción antagonista (Figura 4). [3] Esta interacción se supuso que era establecida a partir de la carga positiva del grupo guanidino. Para comprobar esta idea, partiendo de N-guanilhistamina como cabeza de serie, se obtuvo el análogo isotiurea (Figura 5) al reemplazar el nitrógeno próximo al anillo imidazólico por un átomo de azufre. Así conseguían que la carga positiva de la molécula quedara sólo en la porción final de la cadena lateral. De esta forma, la interacción con el sitio de unión antagonista propuesta sería más fuerte. Se observó un incremento de la actividad antagonista, reforzando así la idea del posible sitio de unión antagonista. [3]

En la síntesis de otros análogos en los que se reemplazaba por un grupo metilo cualquiera de los grupos amino del grupo guanidino, se obtenía una pobre actividad antagonista, concluyendo que son necesarios los dos grupos amino para la unión al sitio antagonista del receptor. Se propuso que los dos aminos del grupo guanidino interactuaban con un grupo carboxilo del receptor por puentes de hidrógeno, por lo que si se quita un grupo amino, se reduce el efecto antagonista. [3] [6]

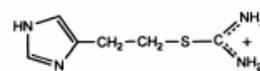


Fig 5. Isotiurea. [3]

A continuación, se propuso la homologación, introduciendo otro carbono en la cadena lateral para ver qué ocurría al alejar el grupo guanidino del anillo imidazol. Se obtuvo un incremento de la actividad antagonista en el caso de homologar la N-guanilhistamina, pero disminuyendo en el caso de la tiourea. Esto hacía pensar que en el

caso de la tiourea, con cadena lateral de dos carbonos, los puentes de hidrógeno con el grupo carboxilo del receptor se establecían a partir de los dos aminos terminales (Figura 6); pero con la N-guanilhistamina (3 carbonos en la cadena lateral), se daba entre un amino terminal y el grupo NH de dentro de la cadena (Figura 6). Además, si un amino terminal se sustituía por S-Me o por Me, no se afectaba la actividad antagonista en este último.

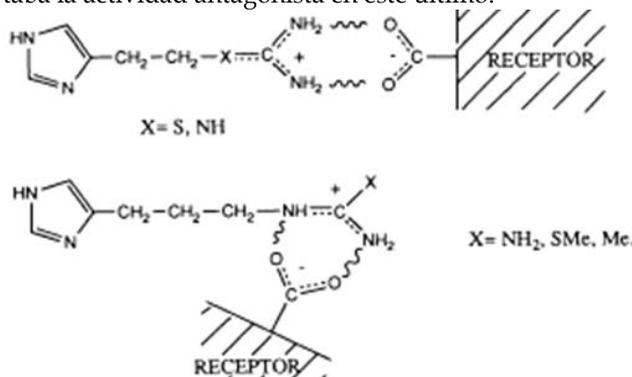


Fig 6. Interacción hipotética entre isotiourea (arriba) y N-guanilhistamina (abajo) con el receptor. [3]

Ahora el objetivo era obtener compuestos puramente antagonistas, encontrando una estructura capaz de diferenciar entre los sitios de unión agonista y antagonista. Esto resultaba difícil, porque la actividad agonista dependía del anillo imidazol y de que los grupos amino cargados se unan por puente de hidrógeno y enlace iónico, mientras que la actividad antagonista dependía también del anillo imidazol y dos enlaces de hidrógeno entre dos aminos cargados y el carboxilato del receptor. Se pensó entonces que quizás no era necesaria la carga para formar los puentes de hidrógeno con el sitio antagonista del receptor, pudiendo así distinguir moléculas que se unan al sitio de actividad agonista y antagonista, ya que para la actividad agonista sí es necesaria la carga en la formación del enlace iónico. En este sentido, se llevó a cabo una técnica de isosterismo, de forma que se cambiase el grupo básico guanidino por un grupo neutro capaz de formar los dos puentes de hidrógeno, pero lo más similar posible en cuanto a propiedades físico-químicas, como tamaño, forma e hidrofobicidad. [3] Así obtuvo un derivado en el que sustituyó el guanidino por un grupo tiourea, el cual era un antagonista débil, pero ya no tenía actividad agonista. Posteriormente, mediante la extensión de la cadena y la adición de un grupo N-metilo se llegó a la burimamida, con una mayor actividad antagonista. El grupo N-metilo beneficiaba la unión al sitio antagonista al incrementar la hidrofobicidad. Por fin, se demostró la existencia de antagonistas de los receptores H₂. [3][4] Sin embargo, se rechazó la utilización médica de la burimamida debido a su baja absorción por vía oral. Para mejorar esto, se centraron en favorecer la ionización del anillo de imidazol. Para ello llevaron a cabo la adición de un grupo metilo en la posición 4 de dicho anillo junto con la introducción de un átomo de S (aceptor de electrones) en la cadena lateral. De esta forma se conseguía favorecer el tautómero ionizado del anillo por resonancia. El compuesto obtenido fue la metiamida (Figura 7). [4] Este

compuesto, era más activo como antagonista H₂ que la burimamida, altamente efectivo clínicamente y se resolvía el problema de la administración oral. Sin embargo, los test de toxicidad mostraban daños renales y agranulocitosis. [7] Posteriormente se llegó a la conclusión de que los efectos secundarios que mostraba la metiamida se debían al grupo tiourea, el cual no es común en el organismo. En este sentido, se decidió sustituirlo por otro con propiedades similares. [3] Se sustituyó el grupo tiourea por un grupo de pKa similar (isosterismo), la N-cianoguanidina, dando lugar a la cimetidina (Figura 7). [4] Este fue el primer antagonista competitivo del receptor H₂ de histamina, inhibidor de la secreción gástrica, con utilidad terapéutica, ya que se eliminan los efectos secundarios y es más potente *in vivo* que la metiamida. [7]

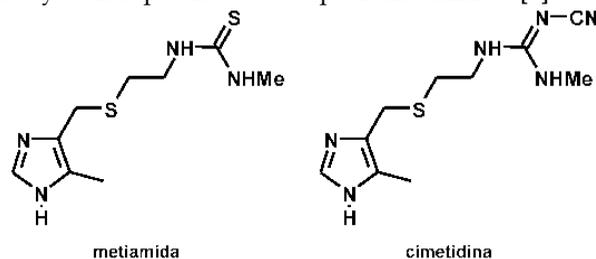


Fig 7. Estructura química de la metiamida (izquierda) y de la cimetidina (derecha).

Más tarde, se descubrió que el anillo imidazólico que se consideró importante en la interacción con el receptor H₂, no era esencial para la actividad antagonista H₂. De ahí se desarrollaron nuevos antihistamínicos de naturaleza no imidazólica, como la ranitidina, que presenta un anillo de furano, la famotidina y la nizatidina, que llegaron a ser más activos que la cimetidina. [4]

3. TRATAMIENTO ACTUAL DE LAS ÚLCERAS GÁSTRICAS Y DUODENALES.

En los últimos años, se ha avanzado mucho en la prevención y el tratamiento de las úlceras gastroduodenales. En el siglo XXI se han producido muchos cambios epidemiológicos, como la disminución de *H. pylori* y el cáncer gástrico, o el aumento en la incidencia de patologías como el reflujo gastroesofágico. [8] Entre los tratamientos que suelen utilizarse más recientemente, encontramos el misoprostol y los inhibidores de la bomba de protones. Gracias a la eliminación de *H. pylori* en países desarrollados, el principal objetivo es la prevención de úlceras provocadas por AINEs. Su tratamiento se lleva a cabo principalmente mediante terapias anti-úlceras profilácticas continuas (misoprostol u omeprazol), o mediante el uso de AINEs con actividad inhibidora selectiva de la ciclooxigenasa inducible-2 (COX-2). Rebamipida es un nuevo fármaco protector de la mucosa, eficaz en la curación de úlceras gástricas. Polaprezinc y nocolprost también son medicamentos protectores de la mucosa, pero se encuentran en desarrollo clínico. Sin embargo, ninguno de estos tres fármacos citoprotectores han sido evaluados por su eficacia en la erradicación de *H. pylori* cuando se administra en combinación con antibióticos. [9]

3.1. Inhibidores de la bomba de protones (PPI).

Los inhibidores de la bomba de ácido gástrico (H⁺/K⁺

ATPasa), se están empleando como fármacos que se dirigen a dicha ATPasa localizada en el entorno ácido de las células parietales del estómago. [10] Allí, gracias a este entorno ácido, se cataliza una reacción que lo transforma en una sulfenamida, produciéndose la inhibición covalente de la bomba de protones, bloqueándose así el último paso de la secreción de ácido gástrico. [11] En el caso de los PPI, la inhibición de la secreción de ácido gástrico se produce de forma irreversible, al contrario que ocurre con los antagonistas competitivos de los receptores de histamina H₂, [12] por lo que el efecto de los PPI es más duradero y efectivo en el tratamiento del reflujo gástrico y de la úlcera péptica. Además, los PPI, y no los antagonistas H₂, se han podido utilizar conjuntamente con antibióticos en el tratamiento de las úlceras favorecidas por *H. pylori*. [11] Los PPI más antiguos, como el omeprazol, lansoprazol, pantoprazol y rabeprazol son eficaces en la curación de las úlceras gástricas y duodenales, y pueden utilizarse conjuntamente con antibióticos si la causa es infección por *H. pylori*. Además, tienen ventajas sobre la ranitidina y el misoprazol, por ejemplo, siendo más tolerados en pacientes que toman AINEs. [13] Otros PPI desarrollados más recientemente son el pantoprazol, rabeprazol y esomeprazol, que actúan de forma similar a los dos anteriores.

3.2. Inhibidores de COX-2.

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tienen efectos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos (ibuprofeno, naproxeno, aspirina) [14] que actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas de producción de la mucosa gástrica; pero tienen un efecto irritante tópico. Esto hace más propensa la complicación de úlceras en los pacientes de alto riesgo de complicaciones ulcerosas que consumen AINEs. [15] Los AINEs clásicos, inhiben tanto la ciclooxigenasa-1 (COX-1), como la COX-2, y con ello la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Sin embargo, la inhibición de la COX-2 es lo que produce los efectos terapéuticos interesantes, mientras que al inhibir conjuntamente la COX-1 se producen los efectos secundarios no deseables (hemorragias digestivas y úlceras), especial problema con la aspirina. De ahí que sea más interesante la utilización de los inhibidores específicos de la COX-2. [14], [15], [16] Entre los inhibidores de COX-2, encontramos celecoxib y rofecoxib, que mantienen los efectos analgésicos y antiinflamatorios, pero reducen los efectos secundarios. [16]

5. CONCLUSIONES

Como consecuencia del problema de las úlceras pépticas, principalmente causadas por *H. pylori* y posteriormente con la generación de los AINEs, surge la necesidad en la búsqueda de soluciones terapéuticas a este problema. En un principio se llegó a una solución que parecía ser buena, la inhibición con los antagonistas de los receptores de histamina H₂. Pero debido al agravamiento por la administración de AINEs, sobre todo en pacientes de alto riesgo de úlceras, surge la necesidad de nuevos fármacos que se puedan administrar de forma sinérgica con los mismos

para paliar sus efectos secundarios, así como la administración conjunta con antibióticos en el tratamiento de úlceras causadas por infección. A posteriori surge la idea de otros AINEs que permiten evitar los efectos no deseados de úlceras, los inhibidores de COX-2. Aún así, sigue habiendo efectos secundarios en los AINEs relacionados con el sistema gastrointestinal y los riñones, especialmente en pacientes de riesgo, por lo que continua siendo un reto y un amplio campo de trabajo la búsqueda de nuevos sustitutos o tratamientos para las enfermedades gastrointestinales.

REFERENCIAS

- [1] Webconsultas. <http://www.webconsultas.com/ulcera/tratamiento-de-una-ulcera-725>
- [2] Web NHS. <http://www.nhs.uk/Conditions/Peptic-ulcer/Pages/Treatment.aspx>
- [3] Graham L. Patric, "An Introduction to Medicinal Chemistry", Department of Chemistry, Paisley University. Oxford University Press Inc., New York, pp. 281-302, 1995.
- [4] Mukund S. Chorghade. "Drug Discovery and Development" Vol. 1 Drug Discovery. John Wiley & Sons, pp. 219-220, 2006.
- [5] Brimblecombe RW, Duncan WA, Durant GJ, Emmett JC, Ganellin CR, Leslie GB, Parsons ME, "Characterization and development of cimetidine as a histamine H₂-receptor antagonist," Gastroenterology, 74 (2 Pt 2), pp. 339-47 Feb 1978.
- [6] <http://ocw.ceu.es/ciencias-de-la-salud/introduccion-a-la-quimica-farmaceutica/TEMAS/tema-11.pdf>
- [7] R W Brimblecombe, et al, "Cimetidine – A Non-Thiourea H₂-Receptor Antagonist," Journal of International Medical Research, 3, pp. 86-92, 1975.
- [8] Francesco Di Mario, Elisabetta Goni, "Gastric acid secretion: changes during a century," Best Practise & Research, Clinical Gastroenterology, vol. 28, no. 6, pp. 953-965, Dec 2014.
- [9] Dajani, E.Z.; Klamut, M.J., "Novel therapeutic approaches to gastric and duodenal ulcers: An update," Expert Opin. Investig. Drugs, vol. 9, pp. 1537-44, 2000.
- [10] Wallmark B, "Omeprazole: mode of action and effect on acid secretion in animals," Scand J Gastroenterol Suppl.166:12-8, 1989
- [11] George Sachs, "Proton Pump Inhibitors and Acid-Related Diseases," Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, vol. 17, no. 1, pp. 22-37, Jan/Feb 1997, doi: 10.1002/j.1875-9114.1997.tb03675.x
- [12] Kawai T, Yagi K, Moriyasu F., "Effect of H₂-receptor antagonist and proton pump inhibitor on the treatment of acid-related disease", Nihon Rinsho, vol. 73, no. 7, pp. 1559-62, 2015.
- [13] Richardson P, Hawkey CJ, Stack WA., "Proton pump inhibitors. Pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders," Drugs, vol. 56, no. 3, pp. 307-35, Sep 1998.
- [14] Web https://es.wikipedia.org/wiki/Antinflamatorio_no_esteroideo
- [15] Anne Ballinger & Geoff Smitha, "COX-2 inhibitors vs. NSAIDs in gastrointestinal damage and prevention," Taylor & Francis Online, Expert Opinion on Pharmacotherapy, vol. 2, no. 1, pp. 31-40, 2001, doi: 10.1517/14656566.2.1.31.
- [16] Salido, M., Abásolo, L., Bañares, A., "Revisión de los antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2," Informa-

ción Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, vol. 25, no. 2, pp. 46-52, 2001.



María Expósito Serrano estudiante del tercer curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. Actualmente alumna interna en el área de genética en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo.

Superficies revolucionarias: Superhidrofóbicas

Laura Zarzuela Moncada

Resumen— La superhidrofobicidad es una propiedad que presentan aquellas superficies que repelen completamente al agua u otras sustancias, y no permiten a las gotas adherirse a su superficie para su posterior penetración. En los últimos años gracias a la nanotecnología se han hecho grandes avances en este campo, los cuales pueden ser de gran importancia en la sociedad.

Palabras Claves— Hidrofobicidad, superhidrofobicidad, nanotecnología, efecto Loto, metal.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es un bien esencial para la sociedad aunque también puede considerarse un factor enemigo para determinados materiales ya sean de construcción o relacionados con otros campos. Gracias a los múltiples avances que se están llevando a cabo en el área de la nanotecnología, científicos están buscando soluciones para estos problemas. Una de las áreas de estudios es la superhidrofobicidad, cuya tecnología permitiría repeler cualquier líquido, agua, aceite u otras sustancias viscosas, haciendo que las superficies dotadas de esta característica cuenten con propiedades muy útiles en la industria, como puede ser la autolimpieza.

Para ello se utiliza el llamado “Efecto Loto” que será detallado en el siguiente apartado, el cual se basa en un ejemplo de la sabia naturaleza.

A lo largo de este artículo trataremos las propiedades de la superhidrofobicidad, en qué se basa y diferentes aplicaciones pues se trata de un tema que está en pleno auge debido a la incipiente ciencia, la nanotecnología.

2. BASE

2.1. Efecto Loto

La flor de Loto (*Nelumbo Nucifera*) es una radiante planta acuática que como ya se ha citado antes, posee propiedades características gracias a las cuales ha llegado a convertirse en un símbolo de pureza en culturas asiáticas. Su capacidad de permanecer siempre secas y limpias ha sido fuente de inspiración de este estudio, pues a pesar de que las hojas de dicha flor sean sometidas a intensas lluvias monzónicas, paradójicamente, estas permanecen secas. Dicha hazaña se debe a un principio que recibe su nombre, el efecto loto, que fue desarrollado en los años noventa por Wilhelm Barthlott. Sin embargo, este efecto también se puede ver en otras especies vegetales como son el *Tropaeolum* o la *Opuntia*, o en las alas de la mariposa Morpho.

Se observa que las gotas de lluvia adoptan una forma es-

férica prácticamente perfecta y recorren la superficie arrastrando con ellas la posible suciedad que se encuentren en su camino.

Esto se debe a la doble estructura hidrófoba de la superficie o epidermis de la planta loto, que presenta dos propiedades complementarias:

1. La existencia de una cutícula cuyas funciones son proporcionar estabilidad estructural, barrera de transpiración y reflejar la luz, entre otras.
2. La presencia de papilas de 10 – 20 micras de alturas y 10 – 15 de anchura, en las que se encuentran superpuestas las ceras epicuticulares, como se observa en la Figura 1 (a) y (b).

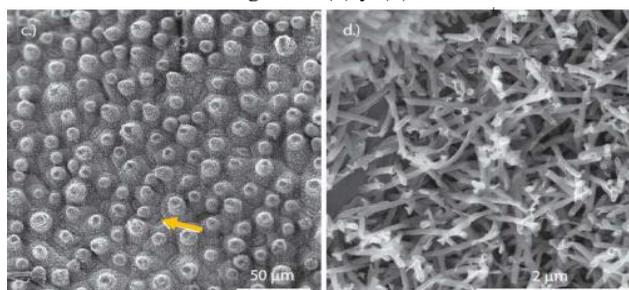


Fig. 1. (a) Imagen de la superficie de la hoja de Flor de Loto donde se distinguen papilas y, en el espacio que hay entre ellas, diferentes esfinesiones (indicado por la flecha) por donde la hoja realiza la transpiración. (b) Imagen de la superficie ampliada de las papilas donde se aprecia que está formada por filamentos de cera cristalina [11].

La combinación de estas propiedades con las químicas y físicas de las gotas de agua hace que estas sean repelidas por la superficie, presentando de este modo una notable hidrofobicidad.

Gracias a esto y a la elevada tensión superficial de las gotas de agua, estas, al impactar sobre la superficie de la planta descansarán sobre las puntas de las protuberancias, quedando aire atrapado entre estas y la propia lámina de agua, de forma que la gota mantenga una forma casi esférica. De este modo, al haber tan pocos puntos de contacto, la gota puede desplazarse rodando sobre la superficie (ver Figura 2).



Fig.2. Hoja de Flor de Loto. [12]

2.2. Ángulo de contacto

La hidrofobicidad puede medirse por el ángulo de contacto entre la superficie y la gota, en este caso de agua. A medida que aumenta el ángulo de contacto, aumenta la hidrofobicidad. Las superficies con un ángulo de contacto menor a 90° son hidrófilas y las que cuyo ángulo es mayor que 90° , hidrófobas. Asimismo, existen superficies que llegan a mostrar más de 150° en las que la superficie de contacto es mínima.

Esto depende de la acción de todas las fuerzas que intervienen en la línea de contacto de la superficie considerándose el equilibrio termodinámico de tres fases: sólido - líquido, líquido - gas y sólido - gas. La ecuación de Young, (1), nos permite hallar dicho ángulo:

$$0 = \gamma_{sv} - \gamma_{sl} - \gamma \cos \theta \quad (1)$$

donde γ es la energía intersuperficial de las interfases (s para sólido, v para gaseoso y l para líquido) y θ el ángulo de contacto en el equilibrio [3], como se muestra en la Figura 3.

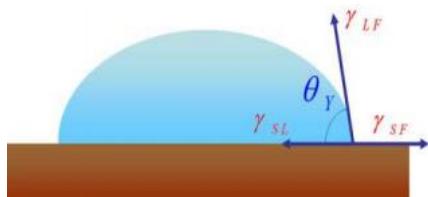


Fig. 3. Esquema donde se muestran las tensiones superficiales, γ , y el ángulo de contacto, θ [13].

La ecuación (1) asume que la superficie es completamente llana, de modo que para acercarnos más a la realidad, estudiaremos casos en los que la superficie presente cierta rugosidad.

Aparece así una modificación de la ecuación de Young. Gibbs pasa a tener en cuenta aspecto que no se habían considerado, tales como el efecto de una interfase sobre las otras dos y la existencia de pequeñas gotas.

3. TRATAMIENTOS

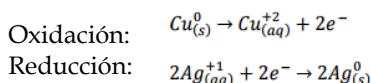
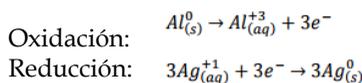
A continuación se expondrán diferentes materiales que presentan superhidrofobicidad.

3.1. Tratamientos químicos

Se trata de una aplicación realmente factible para los metales. Un claro ejemplo puede ser el tratamiento con nitrato de plata, AgNO_3 , sobre dos láminas, de cobre y aluminio respectivamente. Dichas láminas son introducidas en un recipiente con AgNO_3 , lo provoca una reacción entre el nitrato y los metales, reduciéndose los iones Ag^+ .

Tiene lugar una reacción de “desplazamiento”, reacciones redox, en la que el cobre por ser más reactivo desplaza a la plata adhiriéndose. Conseguimos así formar una nanorugosidad en la superficie del cobre [3].

Las reacciones redox son las siguientes:



De este modo enlazamos los iones de cobre con los del metal formando una nanorugosidad en la superficie del cobre, óptima para que las gotas y el ángulo de contacto que se formen sea aproximadamente de al menos 150° .

3.2. Tratamientos industriales

3.2.1. Metal superhidrofóbico

Gracias al incesante trabajo de investigadores estadounidenses se ha conseguido desarrollar un metal superhidrofóbico por medio de una capa superficial de microranuras cubiertas de nanoestructuras complejas, que han sido producidas por pulsos rápidos de un rayo láser [8].

Se trata de una técnica desarrollada por el equipo de Chunlei Guo [6]. Supone la grabación de microsurcos paralelos a una distancia de 0,1 mm. De este modo, cualquier metal que sea sometido a dicha técnica repelerá el agua debido a la cámara de aire que se genera por la compleja estructura de la superficie, tal y como se refleja en la Figura 4.



Fig.4. Imagen real de una gota de agua al impactar sobre la superficie de un metal con microranuras [14].

3.2.2. Ultra- Ever Dry®

Se han desarrollado diferentes productos comerciales entre los que se encuentra la tecnología de *Ultra-Ever Dry*® [9], presentado por UltraTech International, que va más allá, pues puede repeler prácticamente cualquier líquido, ya sea agua, aceite o sustancias viscosas como el barro o el cemento líquido.

Por medio de su pulverización se crea una película de aire gracias a la nanoestructura de sus partículas, lo que impide la penetración o adhesión del material derramado a los poros del material base.

Este revolucionador producto incluye una inmejorable resistencia a la abrasión y la fricción que hace que posea las características mencionadas.

4. APLICACIONES

4.1. Industria automovilística, aeronáutica y naval

Los nuevos metales superhidrofóbicos abren muchas puertas en este ámbito pues como bien dice Jeffrey Youngblood, un profesor de ingeniería de materiales de una Universidad de Purdue, "las estructuras metálicas son más robustas y pueden sobrevivir en ambientes más duros, lo que permite su uso en aplicaciones en las que el plástico es inviable, como en aviones, trenes, automóviles, maquinaria pesada y motores".

En la industria aeronáutica, uno de los problemas es la acumulación del hielo en los motores debido a la condensación. Para evitarlo y minimizar su deterioro, se recurre al calor, pero esto supone un gasto en energía, cosa que se solucionaría con el uso de estos metales.

Por otro lado, el campo de la hidrodinámica está de suerte, pues se reduce la fricción de la superficie con el agua. Además, estos metales evitarían la adherencia de biorganismos marinos de modo que el consumo de combustible de las flotas se reduciría hasta un 40 % al disminuir la fricción. Por este motivo, en el sector naval también supondría grandes avances.

4.2. Higiene

El uso de los pulverizadores o los propios metales puede evitar la proliferación de microorganismos por lo que supone una protección ante enfermedades.

Igualmente, un sanitario podría mantenerse limpio y libre de infecciones minimizándose el uso de agua en países donde este bien mundial escasea.

4.3. Otros

Debido a la amplia variedad de propiedades que poseen estos productos, como pueden ser la autolimpieza, la antihumedad, antiadhesión, anticorrosividad o la resistencia a manchas, se pueden citar innumerables aplicaciones. En la industria textil podría revolucionar el sector de la moda con la fabricación de ropa imposible de manchar.

Sin olvidarnos de los más desfavorecidos, de aquellos que viven en países subdesarrollados donde el agua escasea, una ingeniosa aplicación puede ser el uso de estos metales para crear aparatos de recolección de agua, pues la eficiencia de la recolección aumentaría.

5. CONCLUSIONES

Este análisis muestra que la superhidrofobicidad es una propiedad que tiene el potencial para convertirse en una herramienta muy útil en diferentes sectores, como los ya expuestos.

Esto no sería posible sin la cada vez más desarrollada nanotecnología, ciencia que estudia la modificación de la materia a escala nanométrica para conseguir fines industriales o médicos, entre otros.

No obstante, a día de hoy se sigue trabajando en la mejora de la potencia, la eficacia y la simplificación del proceso para que resulte un proceso industrial rentable.

6. REFERENCIAS

- [1] J. C. J. M. N. Prf. Bharat Bhushan, «Lotus Effect: Surfaces with Roughness-Induced superhydrophobicity, self-Cleaning and Low Adhesion,», Springer, Ohio: Ohio state University.; pp. 1437-1511.
- [2] N. J. S. M. I. N. Paul Roach, "Progress in superhydrophobic surface development," *Soft Matter*, vol 4, pp. 224-240, 2008, doi: 10.1039/B712575P.
- [3] Agustín Fernández Cañete, «Estudio de la Hidrofobicidad y Autolimpieza en Materiales con Nanotratamientos Superficiales,» Barcelona, 2013. https://ddd.uab.cat/pub/treecpro/2013/hdl_2072_234675/P_FC_AgustinFernandezCanete.pdf
- [4] Wikipedia, «Wikipedia,» 23 Noviembre 2015. [En línea]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Ángulo_de_contacto. [Último acceso: 23 Noviembre 2015].
- [5] Wikipedia, «Wikipedia,» 26 Noviembre 2015. [En línea]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Efecto_loto. [Último acceso: 25 diciembre 2015].
- [6] Chunlei Guo and A. Y. Vorobyev, «Multifunctional surfaces produced by femtosecond laser pulses, », *Journal of Applied Physics*, 2015, doi: 10.1063/1.4905616.
- [7] Todd Leopold, «El asombroso metal que hace rebotar el agua, » , CNN, <http://cnnespanol.cnn.com/2015/01/23/el-asombroso-metal-que-hace-que-el-agua-rebote-en-su-superficie/>
- [8] Miguel A. Perez, «Científicos desarrollan un metal superhidrofóbico que repele por completo el agua», 2015., <http://blogthinkbig.com/metal-superhidrofobico-repele-por-completo-el-agua/>
- [9] UltraTech International, UltraEver Dry ®. Available: <http://www.spillcontainment.com/ever-dry>
- [10] Lai, S.C.S. «Mimicking nature: Physical basis and artificial synthesis of the Lotus effect», 26 noviembre 2015., <http://members.ziggo.nl/scslai/lotus.pdf>
- [11] Fernández Cañete, A. (2013). Imágenes de la superficie de la Flor de Loto. [Figura 1]. Recuperado de https://ddd.uab.cat/pub/treecpro/2013/hdl_2072_234675/P_FC_AgustinFernandezCanete.pdf
- [12] Morata, E. (2015). Imagen de la Flor de Loto. [Figura 2]. Recuperado de: <http://atriainnovation.com/conoceis-el-efecto-loto/>
- [13] Fernández Cañete, A. (2013). Esquema donde se muestran las tensiones superficiales, γ , y el ángulo de contacto, θ . [Figura 3]. Recuperado de https://ddd.uab.cat/pub/treecpro/2013/hdl_2072_234675/P_FC_AgustinFernandezCanete.pdf
- [14] Todd, L. (2015). Imagen real de una gota de agua al impactar sobre la superficie de un metal con microranuras. [Figura 4]. Recuperado de <http://cnnespanol.cnn.com/2015/01/23/el-asombroso-metal-que-hace-que-el-agua-rebote-en-su-superficie/>



Laura Zarzuela Moncada es actualmente estudiante de primer curso del Grado en Biotecnología, en la Universidad Pablo de Olavide, en Sevilla.

Extracción de la cafeína con CO₂ supercrítico

Rafael Serrano Durán

Resumen— La cafeína es un producto bastante extendido en nuestra sociedad. Esta puede ser obtenida con la ayuda de los fluidos supercríticos como el dióxido de carbono, que a partir de ciertas condiciones combina rasgos de los gases y de los líquidos.

Palabras Claves— CO₂, fluidos supercrítico, cafeína, café.

1 INTRODUCCIÓN

Suena el despertador, 6:00 de la mañana, temporada de exámenes. Una vez consigues levantarte, vas directo a asaltar la cafetera para poder empezar el día. El 63% de los mayores de 15 años beben al menos un café al día en España [1]. Bendito café. Como todos sabemos esa magia proviene de la cafeína.

La molécula de cafeína, o mejor dicho, 1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona, fue aislada por primera vez por Friedrich Ferdinand Runge en 1820 [2]. Este alcaloide de la familia de las xantinas actúa como un estimulante del sistema nervioso central, aumentando la agitación debido a que bloquea los receptores de Adenosina, sustancia que nos relaja, gracias a su parecido con esta [3]. Podemos encontrar sobre 160 mg de cafeína en 180ml de café, mientras que en la misma cantidad de té o refresco de cola, hay alrededor de 40-100mg y 17-55mg respectivamente [4].

Sin embargo, a veces se desea extraer este compuesto bien para obtener un café descafeinado, para añadirla a otras bebidas, o para su uso industrial, aunque también se puede sintetizar a partir de dimetilurea y de ácido malónico [3]. Para la extracción de cafeína, se pueden utilizar varias técnicas y disolventes como el hexano o el método Soxhlet con acetato de etilo. Pero nosotros nos centraremos en la técnica del CO₂ supercrítico y trataremos de realizar una comparativa con los otros métodos.

2 CARACTERÍSTICAS DE LOS FLUIDOS SUPERCRTICOS.

La materia puede encontrarse en tres estados de agregación básicos: sólido, líquido y gaseoso. Como podemos observar en la figura 1, a determinadas combinaciones de presión y temperatura conseguimos que coexistan ambas fases, llegando a conseguir hasta que puedan encontrarse en las tres. Pero además si hacemos que la temperatura y presión estén por encima del llamado punto crítico, podemos conseguir un nuevo estado intermedio entre el líquido y el gas, el fluido supercrítico.

Las sustancias en esta fase poseen una densidad bastante mayor a la de un gas y una gran capacidad como disolvente. Además es posible modificar estas dos propiedades al variar la temperatura y la presión a la que están sometidos. Para que nuestra sustancia pueda actuar como un disolvente ha de alcanzar una densidad parecida a la del líquido, lo cual aumenta la probabilidad de que las

moléculas de soluto y de disolvente interaccionen, dependiendo ya el tipo y fuerza de la interacción de las

características de las especies (puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión, etc...). Pero a estas propiedades como disolvente hay que añadirle otras propiedades transportadoras de los gases que son interesantes, como una tensión superficial casi nula y una viscosidad entre 5 y 30 veces menor a la de los líquidos, permitiéndole atravesar fácilmente materiales microporosos.[2][5]

Podemos observar estas características en la Tabla 1.

	Gas	Fluido supercrítico	Líquido
Densidad (g/ml)	0,001	0,1-1	1
Viscosidad (cP)	0,01	0,01-0,1	1
Difusividad (cm ² /s)	0,1	0,0001-0,001	< 0,00001

Tabla 1 Comparación propiedades sustancia en diferentes fases. [6]

Debido a que la temperatura crítica aumenta con el peso molecular y con la energía de las fuerzas intermoleculares, podemos utilizar diferentes compuestos en su punto crítico para procesos que se realizan a temperaturas diferentes. Por ejemplo, para procesos sensibles al calor se utilizan CO₂ o etano, cuyas temperaturas críticas rozan la temperatura ambiente. Mientras, en algunos procesos de la industria química como trabajar con polímeros, es mejor usar hidrocarburos de mayor masa molecular [5].

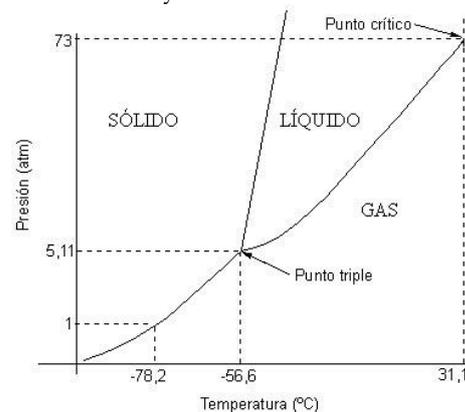


Fig 1. Diagrama de fases del CO₂ [7]

3 MATERIALES Y PROCEDIMIENTO

Los materiales necesarios para la extracción de la cafeína son: Un recipiente de extracción de acero inoxidable de 200ml recubierto con una chaqueta de calentamiento, un recipiente de separación, un regulador de presión alta-alta con dos manómetros y dos cilindros de gas: uno con CO₂

líquido (disolvente de extracción) y otro con N_2 para presurizar el sistema.

Para extraer la cafeína de una muestra, primero se carga en el extractor y el recipiente se satura con el CO_2 . Se aumentan la temperatura y la presión del extractor; y tras esperar un tiempo, se despresuriza el extractor permitiendo que el flujo se dirija hacia el recipiente de separación [2]. Dependiendo de la temperatura, la presión y el tiempo con el disolvente que sometamos a la muestra, los resultados de la extracción serán diferentes.

A continuación, analizamos la muestra extraída mediante espectrometría UV. Para ello, creamos primero una recta patrón midiendo la absorbancia de concentraciones conocidas a 274nm [3] y luego observamos la absorbancia de nuestro extracto y calculamos su concentración con la ayuda de la ley de Lambert Beer.

4 COMPARACIÓN CON OTRAS TÉCNICAS

Según varios trabajos [2,8,9] la técnica de extracción supercrítica con CO_2 es más específica que otros métodos como la extracción Soxhlet con acetato de etilo, la extracción con cloroformo, o con otros disolventes orgánicos. Al extraer más cafeína por masa de café, el rendimiento con CO_2 es mayor.

5 CONCLUSIÓN

Como hemos podido observar, las interesantes características de los fluidos supercríticos (densidad cercana a la del líquido, tensión superficial cercana al cero, viscosidad parecida a la del gas...) y la posibilidad de modificar estas con la temperatura y la presión, hacen de las sustancias en este estado buenos disolventes para realizar extracciones. Como por ejemplo la extracción de la cafeína con CO_2 que nos permite conseguir este producto tan apreciado.

REFERENCIAS

- [1] "Informe Café & Té: Hábitos de Consumo de Café en España." [Online]. Available: [http://www.federacioncafe.com/Documentos/Prrensa/Noticias/Estad%C3%ADsticas Informe Caf%C3%A9 y T%C3%A9.pdf](http://www.federacioncafe.com/Documentos/Prrensa/Noticias/Estad%C3%ADsticas%20Informe%20Caf%C3%A9%20y%20T%C3%A9.pdf). [Accessed: 13-Dec-2015].
- [2] P. Fabián, A. F. Ordóñez, N. Y. Rojas, and I. Rodríguez, "Supercritical extraction," 2006. [Online]. Available: <http://www.scielo.org.co/pdf/ring/n24/n24a5.pdf>. [Accessed: 21-Nov-2015].
- [3] Web de pubchem <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519>
- [4] American Society of Health-System Pharmacists 2013; Drug Information 2013. Bethesda, MD. 2013, p. 256
- [5] M. McHugh and V. Krukons, *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, pp 8-14, 2013.
- [6] D.S. Murray, & P.J Hansen, J. Chem. Education. 1995, pp. 72-851
- [7] Universidad de Granada "Experimentos con CO_2 " [Online]. Available: <http://fciencias.ugr.es/practicadocentes/wp-content/uploads/guiones/ExperimentosConCO2.pdf>
- [8] S. B. Hawthorne, C. B. Grabanski, E. Martin, and D. J. Miller, "Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix," *J. Chromatogr. A*, vol. 892, no. 1-2, pp. 421-433, Sep. 2000.
- [9] H. İçen and M. Gürü, "Extraction of caffeine from tea stalk and fiber wastes using supercritical carbon dioxide," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 50, no. 3, pp. 225-228, Oct. 2009



Rafael Serrano Durán

es estudiante de primer curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide, curso 1516.

The discovery of Quarks

Marjorie Dufaud

Summary— Like numerous scientific discoveries, quarks were postulated before their discovery could be proven experimentally. Indeed, several researchers had predicted the existence of those elementary particles but it is the American Murray Gell-Mann of the Technology Institute of California that named them after a poem from James Joyce – “Three Quarks for Mr Marks” – the word quark has thus no real etymological meaning.

Keywords — Elementary particles, fermion, hadrons, leptons, particle accelerators

1. INTRODUCTION

Chemistry concepts usually draw on atoms (from the Greek *ἄτομος* [atomos], “indivisible”), composed of electrons, protons and neutrons, as the smallest particles of matter, from which all the rest is made. Those particles are fundamental as they are at the basis of all chemical reactions. In the 1960s, it has been discovered that they were in fact made up of even smaller particles, today known as quarks.

As such, quarks are considered to be the smallest elementary particles that have been discovered until now [1], an elementary particle being a particle with an unknown composition, it might be composed of other smaller particles or not [2]. Due to their spin of $\frac{1}{2}$ (half-integer spin), they are classified in the fermion family.

When quarks gather, they give rise to hadrons [1], which are particles made from other subatomic particles linked by the strong interaction [3]. This is the case of protons and neutrons for instance. Studying hadrons is the only way of gathering information about quarks, their confinement properties preventing their direct observation [1]. Indeed, when you try to isolate a single quark, an anti-quark forms and joins it, transforming it into a hadron [6].

2. ONE STEP TOWARDS QUARKS

In the 1930s, elementary particles were divided into two families: hadrons, sensitive to the strong interaction (protons and neutrons) and leptons, insensitive to this same interaction (electrons and neutrinos). To these two families photons were added which are non-material particles considered as ‘light particles’ [5].

Over the years, this basic classification became more complex due to the discovery of new hadrons in cosmic radiation and particle accelerators.

In the early 1960s, physicists Jerome Friedman, Henry Kendall and Richard Taylor were working at the Stanford Linear Accelerator (SLAC), on a scientific issue. Previous experiments had shown that the size of a proton was measurable, inducing that its volume might contain particles even more fundamental. The study led to the disco-

very of three charged ‘grains’ in protons, within the nucleon, as well as in neutrons. They were named ‘parts’ and were not called quarks back then, but the term was introduced soon thereafter [5]. The three scientists were awarded the Nobel Prize for their discovery in 1990 [6].

At the end of the 1960s, three types of quarks had been discovered: up (electric charge: $\frac{2}{3}$), down (electric charge: $-\frac{1}{3}$) and strange (electric charge: $-\frac{1}{3}$). The first two are the lightest quarks, found in protons (Fig 1). The third one was named strange due to its unusually long lifetime [4].

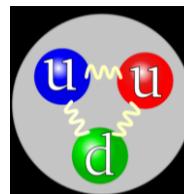


Fig. 1. A proton is made of two quarks up (u) and one quark down (d).

3. THE DISCOVERY OF MORE QUARKS

The existence of a fourth quark had been predicted a couple of years before it was actually discovered in 1974 by two independent scientific teams. It was considered too massive to be directly observed by the previous accelerators but its existence explained that some interactions were not possible. It was first named ‘psi’ by one team and ‘J’ by the other team [6] before finally being termed charm (electric charge: $\frac{2}{3}$), in reference to magic as it allowed to solve many contradictions between current theory and experimental results [4,5].

The discovery of this fourth quark allowed to link leptons (electric charge: -1) and quarks because theory expects an equal number of elements in each category, giving rise to a new classification of elementary particles divided in two families: the electron and its neutrino along with quarks up (u) and down (d) on one hand (first generation), the muon and its neutrino along with quarks strange (s) and charm (c) on the other hand (second generation) [5,6].

4. UNEXPECTED DISCOVERY

In 1975, the discovery of a third lepton (tau) reopened predictions on quarks' family that would probably contain more than four types as both leptons and quarks are considered to be linked [5].

Once again, predictions were confirmed with the discovery of two more quarks: bottom (electric charge: $-1/3$) in 1977 at the Fermi National Accelerator Laboratory (Fermilab) near Chicago and top (electric charge: $2/3$) in 1995. This last one was discovered in a particle accelerator specially designed to enable its discovery (Fig 2) [6]. It is the heaviest quark, as massive as a gold nucleus, which actually represents forty times the mass of a bottom quark [4,6].



Fig 2: The Collider Detector at Fermilab that allowed the discovery of the top quark.

According to these new discoveries, a new classification has been made. It consists of three generations, corresponding to six quarks and six leptons (Fig 3) [5].

Quarks	u up	c charm	t top
	d down	s strange	b bottom
Leptons	ν_e e neutrino	ν_μ μ neutrino	ν_τ τ neutrino
	e electron	μ muon	τ tau
	I	II	III ← Generations

Fig 3: Classification of elementary particles

5. CONCLUSION

The existence of quarks was postulated in order to match theory and experimental observations. Successively, new types of quarks were introduced, and to confirm their discovery the development of new, more powerful accelerators and tools were required.

Considering the history of the discoveries of different kinds of quarks, it would be tempting to think that more

will be discovered in years to come. However, astronomers have declared that according to the outcome of their research on supernovae, only six types of quarks are conceivable in the Universe, the very six already discovered. This would bring the inventory to a close, but not so the study of their fascinating properties.

REFERENCES

- [1] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Quark>
- [2] https://fr.wikipedia.org/wiki/Particule_élémentaire
- [3] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Hadron>
- [4] <http://www.particleadventure.org/quarknaming.html>
- [5] <http://www.larecherche.fr/idees/back-to-basic/quarks-01-03-2001-88140>
- [6] <https://www.learner.org/courses/physics/unit/text.html?unit=1&secNum=5>



Marjorie Dufaud. French student in biotechnology (Erasmus) at Universidad Pablo de Olavide.

Biopolímeros, un vistazo del presente al futuro

Manuel Álvarez de las Heras, Laura Barroso Burgos, Alejandro Becerra Villafranca, Virginia García-Calabres Marin

Resumen— Cuando decimos biopolímero, podemos imaginarnos la doble hélice de ADN o la cadena de aminoácidos que forman la hemoglobina. Así es, un biopolímero es un polímero sintetizado por un ser vivo. Pero podemos ir más allá de ese concepto. ¿Plásticos “auto-degradables”? ¿Envases comestibles? ¿Fármacos que se administran “solos”? Y otras preguntas de todo tipo sobre los biopolímeros están apareciendo en ámbitos como la ingeniería de tejidos o la biomedicina. Poco a poco se están respondiendo, pero seguramente, el futuro nos proponga nuevas aplicaciones de estos materiales.

Palabras Claves— Biopolímero, Aplicaciones, Fármacos, Ingeniería.



1. POLÍMEROS Y BIOPOLÍMEROS. BREVE INTRODUCCIÓN A SU HISTORIA

Sabiendo que un polímero es una macromolécula compuesta por una o varias unidades llamadas monómero, los cuales se repiten en forma de “cadenas”; podemos decir que los biopolímeros son, a su vez, polímeros producidos por sistemas biológicos o derivados químicos de estos sistemas [1].

Debido a ello, no podemos hablar de biopolímeros sin conocer brevemente la historia de los polímeros.

El uso de los polímeros a lo largo de la historia ha estado relacionado con nuestro conocimiento sobre su estructura, e incluso síntesis.

Polímeros típicos como el almidón, la celulosa, la lana (que son biopolímeros)... han sido utilizados desde siempre por la sociedad.

El primer polímero de gran impacto social fue un biopolímero, el hule (el conocido caucho obtenido de árboles como *Castilla elastica*) utilizado para fabricar todo tipo de productos plásticos.

En 1839 Charles Goodyear aplicó la vulcanización sobre el hule, obteniendo una sustancia más resistente.

Otro acontecimiento a destacar fue la modificación de la celulosa, formando fibras sintéticas llamadas rayones.

Los biopolímeros sentaron las bases de la producción de polímeros sintéticos, ya que los primeros polímeros que se sintetizaron se obtenían a partir de los biopolímeros. Ejemplos son el caucho vulcanizado mencionado anteriormente, o la síntesis de nitrato de celulosa en 1846 por el químico Christian Friedrich Schönbein.

El primer polímero totalmente sintético se obtuvo en 1907. Fue Leo Hendrik Baekeland con su baquelita a partir de formaldehído y fenol.

En 1926, el químico alemán Hermann Staudinger sentó las bases teóricas de los polímeros como largas cadenas de monómeros. En 1953 recibió el Premio Nobel de Química por su trabajo.

Esta industria experimentó otro gran avance en la Segunda Guerra Mundial, por la búsqueda de nuevos materiales para sustituir las materias primas con las que se hacían los distintos productos o armas de combate.

Ejemplos de esto son el caucho sintético usado por

Alemania para las ruedas de los tanques; el nailon usado por EE.UU para fabricar paracaídas o prendas...

En la segunda mitad del siglo XX se desarrollaron nuevos métodos de obtención de polímeros y aplicaciones, como los catalizadores metalocénicos, fibras de alta resistencia...

Y así hasta nuestros días.

Así como de variados son los polímeros, también existe una amplia variedad de biopolímeros. Debido a esto, se suelen atender a varios criterios para clasificarlos, como el tipo de monómero, el tipo de enlace, el tamaño o posición espacial, propiedades físico-químicas, ubicación celular u origen.

Hoy día, sus aplicaciones, como veremos, son muy diversas, pero destaca su utilización en los sectores de medicina, alimentación e ingeniería de tejidos: equipos e instrumentos quirúrgicos, implantes dentro del cuerpo, envases comestibles [2]....

2. APLICACIONES

Las aplicaciones de los biopolímeros son hoy día uno de los campos de mayor interés, ya que abren nuevas vías a la creación de dispositivos terapéuticos, cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos; sustitutos de la piel; sistemas de liberación de fármacos; polímeros autodegradables...

Veamos los ejemplos más representativos:

2.1. Bioplásticos

Esta aplicación está basada en la creación de plásticos biodegradables: aquellos que pueden ser eliminados mediante la actuación de sistemas biológicos como los microorganismos, ya sea por la actuación de enzimas hidrolíticas u otros mecanismos del microorganismo.

Se están desarrollando bioplásticos derivados de com-

ponentes naturales como el almidón, el aceite de soja o la celulosa. Un ejemplo representativo de bioplástico es el ácido poli(γ -glutámico) (PGGA) obtenido a partir de la bacteria *Bacillus megaterium*.

El PGGA, Figura 1, es un nylon 4 sustituido en el carbono 4 con un grupo carboxilo, una poliamida susceptible de hidrólisis química tanto en medio ácido como básico. Se degrada rápidamente con agua a temperaturas por encima de 60°C, y por la acción de 12 especies diferentes de bacterias, usando enzimas como la enzima poliglutamil γ -hidrolasa [3].

Estos bioplásticos contribuyen al desarrollo sostenible, debido a su origen (los recursos renovables), pero todavía no están a altura del plástico convencional, debido al limitado y alto costo de producción del bioplástico en comparación con el plástico producido a partir del petróleo [4].

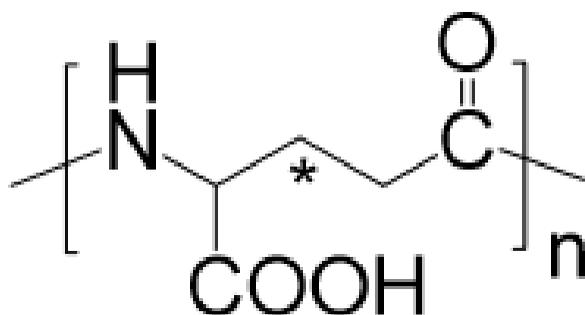


Fig. 1 (obtenida de [3]): Estructura química del ácido poli(γ -glutámico) (PGGA). Consiste en una cadena de aminoácidos glutamato unidos mediante un enlace gamma. El carbono quiral (representado mediante un asterisco) da gran versatilidad química a este compuesto.

2.2. Envases comestibles

Esta aplicación tiene su base en el BiLac®, Figura 2, biopolímero obtenido a partir de la cepa bacteriana *Leuconostoc mesenteroides*, y usando como materias primas sacarosa y glucosiltransferasa. Además, se caracteriza por sus propiedades de biodegradación y biocompatibilidad.

Dadas sus características físicas y químicas, este biopolímero no solo se tiene pensado usar como la típica bolsa transparente de plástico para llevar alimentos, sino que incluso serviría de condimento para el alimento que está recubriendo.

Esto es debido a que se ha observado notables propiedades de barrera; capacidad para resistir fenómenos de permeabilidad, absorción e intercambio de gases, vapores; protección frente a radiaciones...

Por ello, y concluyendo, según el alimento (verduras, carne, frutas...) y las condiciones de humedad y temperatura, elegiríamos una "bolsa" u otra para llevar estos alimentos, y cuando fuéramos a comérselo, no haría falta ni sacarlo de la bolsa (en el caso de la fruta, ya que la car-

ne cruda nunca sienta bien si no se cocina primero).

También, se plantea usar en el recubrimiento de principios activos y excipientes de los medicamentos.

Estas propuestas buscan reducir los impactos negativos de los actuales envases de origen petroquímico y conservar al máximo la calidad del producto [5].



Fig. 2 (obtenida de la página web de la Universidad Nacional de Colombia): Biopolímero BiLac®, desarrollado por estudiantes de pregrado y postgrado de Diseño Industrial, Dietética y Psicología, abre nuevas posibilidades en el almacenamiento y protección de alimentos, entre otras.

2.3. Medicamentos

Principalmente, los biopolímeros se utilizan para la creación de sistemas de liberación del fármaco y sensores para propósitos de diagnóstico.

Los sistemas de liberación de fármacos consisten en estrategias para administrar el fármaco en su concentración óptima a través de una matriz polimérica, disminuyéndose el número de dosis necesarias del medicamento.

En este contexto, los biopolímeros pueden controlar esta dosificación por varios mecanismos.

Un mecanismo destacable es el de liberación controlada por difusión, Figura 3, en la que el biopolímero forma una membrana que engloba al fármaco, reservorio, del cual difunde el medicamento en la concentración adecuada.

La salida del fármaco también puede estar controlada por activación de solvente, Figura 4, donde el biopolímero contiene el fármaco, y su velocidad de salida está regulada por el flujo de agua; ya que el biopolímero puede hincharse, generando canales o poros para la salida del fármaco.

Y, finalmente, mencionar otros sistemas de liberación usados, donde el control lo lleva a cabo una reacción química o enzimática, ya que la liberación del fármaco está determinada por la degradación del biopolímero (por enzimas, reacciones de otra naturaleza...); o el ambiente fisiológico (variaciones de las condiciones físico-químicas

del ambiente desencadenan la salida del fármaco) [5].

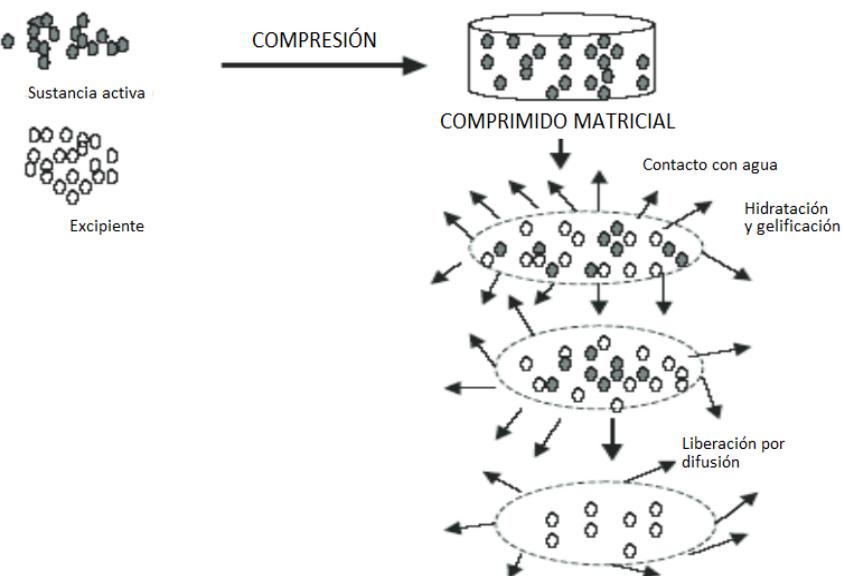


Fig. 3 (obtenida de [6]): Esquema de un sistema controlado por difusión. La presencia de agua favorece la liberación de la sustancia activa almacenada en el espacio formado por la membrana hacia el medio.

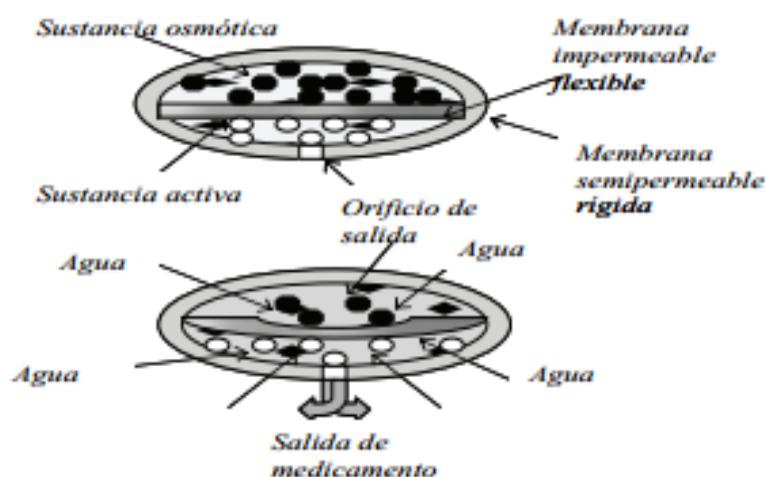


Fig. 4 (obtenida de [6]): Esquema de una bomba osmótica. La entrada de agua provoca el "hinchazón" del biopolímero, permitiendo la salida del fármaco.

Otro campo de la farmacología en el que los biopolímeros están teniendo un gran impacto es en la mejora de la absorción de fármacos, ya que pueden favorecer el paso del medicamento a través de las barreras de nuestro organismo, condición básica para la correcta acción de los sistemas farmacológicos.

Un ejemplo de cómo los biopolímeros pueden contribuir es el empleo de polímeros aniónicos basados en PAA (ácido poli(acrílico)) o PMAA (ácido poli(metacrílico)) para la administración por vía oral del fármaco; ya que estos biopolímeros atrapan iones de calcio en la luz intestinal, generando modificaciones en la membrana gastrointestinal que facilitan el paso de las macromoléculas hacia el torrente sanguíneo [6], [7].

2.4. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos usa biomateriales. Los biomateriales son aquellos diseñados para actuar en sistemas biológicos con el objetivo de evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo.

Dentro de la gran lista de biomateriales que se podrían mencionar, están incluidos los biopolímeros.

Estos son diseñados para tener un tiempo de vida limitado o un tiempo de vida ilimitado; siendo el segundo caso el más habitual porque los biopolímeros son usados principalmente para actuar como soporte físico, incluso bioquímico, de las células de los tejidos.

Así, destaca su uso en sistemas cardiovasculares, ortopédicos, dentales.

Ejemplo de esto son los stents coronarios; malla que se introduce en arterias obstruidas a través de un catéter y se despliega dentro de la arteria, facilitando la circulación sanguínea. Existe un prototipo, el stent REVA, que está compuesto de un biopolímero de policarbonato derivado de la tirosina. Pero por ahora los más conocidos y usados son los de aleaciones de metales.

También es destacable el uso de los polímeros poliláctico y poliglicólico y sus copolímeros en el soporte mecánico.

Diversas líneas de investigación sugieren usar el copolímero PLA-PGA para formar andamios porosos o portadores de las células, componentes de la matriz extracelular, o agentes bioactivos. Sin embargo, todavía debe estudiarse su biocompatibilidad y el uso a gran escala [6],[7].

3. CONCLUSIONES

Podemos afirmar que las características físico-químicas de los biopolímeros (resistencia mecánica, biocompatibilidad, versatilidad...) dan lugar a un gran abanico de posibilidades, sobre todo, en el campo de la ingeniería de la salud y la farmacología.

Los bioplásticos aumentan cada vez más su repercusión en la sociedad y dentro de poco podrían dar el gran salto al mercado. Empresas de la industria química y de materiales sintéticos ya han invertido varios miles de millones de euros en esta nueva tecnología, buscando que los bioplásticos le hagan la competencia a los plásticos convencionales.

Además, los biopolímeros se procesan para formar piezas moldeadas, productos semielaborados o láminas... pudiendo hacerse todo tipo de envases, productos de catering, productos para jardinería... todo ello biodegradable.

Los biopolímeros reforzados con fibras e hidróxidos de metal son fácilmente moldeables e ignífugo.

Y otras tantas aplicaciones en la industria de la construcción, la industria óptica, la fabricación de automóviles...

Pero eso no quiere decir que sea la única opción. Hace relativamente poco tiempo que se estudia el uso de los biopolímeros como material, así que, aunque a día de hoy no tengan una elevada repercusión, puede que el día de mañana sean, por ejemplo, uno de los pilares de la economía. Quien sabe.

Manuel Álvarez de las Heras, Laura Barroso Burgos, Alejandro Becerra Villafranca, Virginia García-Calabres Marin, estudiantes de segundo año del Grado de Biotecnología.



REFERENCIAS

- [1] Michel Vert, Yoshiharu Doi, Karl-Heinz Hellwich, Michael Hess, Philip Hodge, Przemyslaw Kubisa, Marguerite Rinaudo and François Schué. "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)" Vol. 84, No. 2, pp. 384-386, 2012.
- [2] Web de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia. http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211619/Contenido_e_n_linea_eXe/leccin_29_biopolimeros.html
- [3] José Antonio Portilla Arias. "Synthesis, characterization and biomedical applications of microbial polymalic and polyglutamic acids derivatives". Pp 21-30.
- [4] Pascual Bolufer, "Los biopolímeros, el plástico del futuro" Instituto Químico de Sarriá.
- [5] María Carolina Vives Habeych. "In vivo fermentability of the BiLac ® bio polymer and determination of the production of short chain fatty acids". 2010. Pp 6 - 9.
- [6] Manuel Guillermo Rojas Cortés, Bibiana Margarita Vallejo Díaz y Jairo Ernesto Perilla, "Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico", Ingeniería e Investigación, vol. 28, núm. 1, abril, 2008, pp. 57-71, Universidad Nacional de Colombia.
- [7] Julio San Román, Alberto Gallardo, Blanca Vázquez, Antonio López Bravo. "Ingeniería de tejidos: contribución de los polímeros al desarrollo de los procesos de regeneración tisular". Anales de la Real Sociedad Española de Química. Segunda Época. Enero-Marzo 2000.

Cryopreservation, it will chill you.

Laura Pérez, Adolfo Rodríguez, Carlos Saúco

Abstract— Tardigrades are micro-animals capable of undergoing cryptobiosis, a freezing process that allows them to survive in damaging environments. Scientists have taken advantage of this capacity for cryopreservation, conserving cells and tissues in time using different techniques such as vitrification for embryos, encapsulation-dehydration for plants or profound hypothermia in surgery. The mechanism is ruled by thermodynamics processes that follow a loss of water by a chemical potential gradient.

Key words— Cryopreservation, Cryptobiosis, Encapsulation-Dehydration, Freezing, Tardigrade, Recrystallisation, Vitrification



1. INTRODUCTION

Cryopreservation is the fact of freezing cells or tissues to preserve them in the future. Did you know that Darth Vader used it with Han Solo in one of the Star Wars movies? This method drags many years of researches related to the thermodynamic process of freezing and is based on some organisms like tardigrades. Moreover, it can be extended to many fields such as plants storage, surgery or in vitro fecundation.

2. HISTORY

The phenomena of cryptobiosis, a metabolic state of inactivity in which some organisms enter in response to adverse conditions [1], has been studied since the second half of the XVI century. At those times, biologist realized that this period of inactivity could vary from hours to years, being caused by a huge variety of stimuli: extreme temperature, unavailability of food or water, desiccation or oxygen deficiency [2], [3]. Cryptobiosis includes three physiological states, anhydrobiosis, osmobiosis and cryptobiosis [2].

An important discovery in relation to cryptobiosis, in 1702, was the identification of an organism capable of adapt in many adverse environments [4]. These organisms were called Tardigrades, and were first described in 1773 [5]. They are now known for being able to survive - at least for a few minutes- at temperatures from -272°C to 151°C ; and for resisting extreme pressures as vacuum; dehydration and radiation [4]. In those cases of extreme environments the metabolism of these creatures reduces to 0.01% of the normal activity, and the water content of the body also decreases to 1% of the normal volume [5].

From the study of phenomena like cryptobiosis a new idea crossed the mind of some scientist: cryopreservation. The history of cryopreservation starts in the early XX century, when James Lovelock suggests that the damage caused in blood cells when frozen could be due to osmotic stress [3]. Here, several studies were done in this area of frozen living cells and it was in 1949 when Ernest John Christopher Polge accidentally discovered the cryoprotective properties of glycerol on fowl sperm. This meant the

start of a new field of study which soon began to grow exponentially [6]. From that point, many of those researches were performed in order to learn a way of freezing sperm cell, so that in vitro fertilization became possible.

In 1953 Jerome K. Sherman was successful in freezing and thawing human sperm, and on the same year he founded the first sperm bank. Despite all of the discoveries taken place in the XX century, it was not until 1964 that the term cryobiology was invented and it was defined as a science. In the 80s, several discoveries were done in relation to insemination and pregnancy. For example, in 1986, an Australian biologist called Christopher Chen was successful in the freezing of human oocytes, and this meant a huge step in the fertility field [6].

3. TARDIGRADE'S BIOCHEMISTRY

As tardigrade was one of the first organisms found in relation to cryptobiosis, investigating its genome was crucial to know more about that topic. After sequencing its DNA, it was found that their genome was the most different one from any other animal. They only share about the 17% of their genomic sequence with other species [7].

In a study carried out with different species of tardigrades from different environments, the main points that an organism has to overcome in order to survive cryptobiosis were defined. These critical points are the process of freezing, the energy needed to enter this physiological process and end of the cryptobiosis event. A too rapid freezing could induce physical damage; it is also possible that the organism has not enough energy to deal with this process, so it would die. The ending of the frozen state is also important, as if there has been any damage it should be repaired before 'coming back to life' [8].

In order to survive in extreme environmental conditions, tardigrades are capable of carrying out some preparative steps like losing most of their water, -around the 95%- synthesizing cell protective components and reducing dramatically their metabolism [9]. One of the components that are known to have a cryoprotective role in tardigrades is the ice nucleating protein. These proteins are

important to control the freezing of the body of tardigrades in order to prevent sudden and damaging ice formation [10].

There exist factors which may affect the survival of tardigrades during cryptobiosis. These are similar to the ones affecting these organisms during desiccation and are caused mainly by reactive oxygen species (ROS). ROS can cause damage in macromolecules when the tardigrade is in a cryptobiotic state and, as we have already mentioned, it has to be repaired before the organism leaves this state [11].

As we have said before, another aspect that is important when cooling down is the velocity by which the negatives temperatures are reached. In a recent research, it has been demonstrated the correlation between this velocity and the rate of survival. A possible explanation for this correlation is that, when the temperatures decreased gradually, the organism has time enough to produce all the substances required. On the other hand, when it happens suddenly, there is no way of producing all the compounds [8].

In general terms, the process of cryptobiosis needs such a complicate mechanism, in which many substances and specific conditions are required. That makes all the organisms capable of doing it an important center to focus on for future researches.

4. THERMODYNAMICS OF THE PROCESS

The intracellular medium of living cells is composed essentially by liquid water, and its solidification by freezing is lethal most of the times. However, it is also possible to preserve cells for long periods of time in a frozen viable state. This process slows and even stops some biochemical reactions, but other ones are accelerated at the same time [12].

The physical events which take place in this process of freezing depend on the cooling velocity. If it is slow, water will be lost quickly enough by exosmosis to concentrate the intracellular solutes in order to eliminate supercooling and maintain the chemical potential of water inside the cell at equilibrium with the potential of the extracellular medium. As a result, there is a dehydration of the cell and its intracellular medium does not freeze. On the other hand, if the cell is cooled at a high velocity it will reach equilibrium by freezing intracellularly as it will become increasingly supercooled [12].

The rate of water loss during this process can be described by different equations proposed. The first one associates this rate of loss of cytoplasmic water with the chemical potential gradient expressed as a ratio of vapor pressure [12]:

$$dV/dt = \left(L_p A R T \ln \frac{P_e}{P_i} \right) / V_i^0 \quad (1)$$

V: Volume of cell water. **A:** Surface area. **t:** Time.
R: Gas constant. **T:** Temperature. **V^o_i:** Water molar volume.
L_p: Permeability coefficient for water.
P_e, P_i: Vapor pressure of extracellular and intracellular water.

This equation derives from the combination of two simple principles. One is the application of Fick's Law to the rate of water loss of a cell, which is given by the permeability constant of water (**L_p**), the cell membrane area (**A**) and the osmotic pressure gradient between extracellular and intracellular media (**π_i - π_e**). As the osmotic pressure is a function of the vapor pressure, we can combine these two equations to get equation 1:

$$dV/dt = L_p A (\pi_i - \pi_e) \quad (2) \quad \pi v = RT \ln P^0 / P \quad (3)$$

The change of vapor pressure with temperature can be calculated from Clausius-Claperyon equation and Raoult's law [12]:

$$\frac{d \ln(P_e/P_i)}{dT} = \frac{L_f}{RT^2} - \left[\frac{N_2 V_i^0}{(V + N_2 V_i^0) V} \right] dV/dT \quad (4)$$

N₂: Osmoles of intracellular solute.

L_f: Latent heat of fusion of ice.

Finally, **L_p** is related to temperature by the application of the Arrhenius equation, which gives the dependence of a rate constant (in this case **L_p**) on the absolute temperature **T**, in relation to the activation energy of the process:

$$L_p = L_p^g \exp[-E/R(1/T) - (1/T_g)] \quad (5)$$

L_p^g: Permeability coefficient of water at a temperature **T_g**.

E: Activation energy.

There are two important variables which essentially condition the survival of cells that have been frozen. Firstly, the appearance of intracellular ice crystals depends on the rate of the cooling process. Rapid cooling rates produce small crystals, and the higher the cooling rate is, the smaller the crystals will be. However, these small ice crystals are thermodynamically unstable, so they will have a tendency to aggregate during warming to form larger crystals [12].

This process is known as recrystallization, and it is related to the second variable which conditions the survival of cells: the rate of subsequent warming. Slow warming will be harmful to frozen cells as it provides them time enough so the process of recrystallization occurs. But, how does recrystallization condition the survival of cells?

Even though this question has not yet been clearly answered, it has been proven that there exists a correlation between this process and cell death in yeast, plant cells [13] and some other tissue culture cells [14]. Some studies report that "the presence of intracellular ice during warming is innocuous but it may lead to a change in another unknown component which then causes injury" [15].

5. APPLICATIONS

5.1 Surgery

A type of light cryopreservation is profound hypothermia. It is used in humans while operating in complex cardiovascular surgical procedures. It is based on the fact that cooling sufficiently the organism may effectively stop all cerebral activity and is able to provide protection for all the organs considered vital. The temperature to reach is 10-14°C around and it is made by a heart-lung machine that makes the blood to pass through a cooling chamber. After the intervention, the blood is gradually warmed using the same apparatus [16].

5.2 Plants storage

Cryopreservation is applied to species that are unable to be stored by other means and are sensitive to the medium (i.e. dehydration). Furthermore, endangered species can be conserved in such a way that their imminent extinction is evaded. All the process is useful as it is value-for-money, a small place to store is needed and contamination by microorganisms is avoided [17].

The most popular plant material for cryopreservation is the so called encapsulation-dehydration of shoot tips, based on the production of artificial seeds. These shoots need to be pregrown in an enriched liquid medium and it needs to be partially desiccated to freeze as it facilitates the cryopreservation [18]. Apical meristems are commonly used in this process as they contain a relatively small vascular system [17].

5.3 Cryopreservation of embryos

Fertilized eggs are called embryos [19]. Embryo cryopreservation is considered very useful for pregnant mothers that used in vitro fertilization, as they can save the embryos and are able to return for another pregnancy some years later. Moreover, the ones that are left over could be donated and used by another couple willing to have a baby or it is even possible to provide them to investigation or destroy them (as the Spanish Law of assisted reproduction techniques marks) [20]. The current process followed to freeze is denominated vitrification. Through it, the water molecules of embryos are removed and replaced with cryoprotectant and then introduced into liquid nitrogen. This quick change of temperature (-12.000 degrees Celsius per minute) is going to create a *glass* state, where embryos are vitrified. It also reduces the possibility of intercellular ice crystals to be formed, thus protecting the future baby [18].

6. CONCLUSIONS

The cryopreservation discovered in the process of cryptobiosis in micro-animals such as tardigrades has made it possible to make progress in the storage of living beings or their tissues in order to maintain them through time. The method requires a great loose of water from the organism, mechanism that is naturally based on a chemical

potential gradient, thus Clausius-Claperyon equation and Raoult's law apply. Many applications have been developed thanks to this behavior, as the cryopreservation of embryos during in vitro fecundation.

REFERENCES

- [1] Clegg JS Cryptobiosis a peculiar state of biological organization
- [2] Withers PC, Cooper CE Metabolic depression: a historical perspective
- [3] https://en.wikipedia.org/wiki/Cryopreservation#cite_note-2
- [4] <http://www.newworldencyclopedia.org/entry/Tardigrade>
- [5] https://sun.iwu.edu/~tardisdtp/tardigrade_facts.html
- [6] <http://ivfqa.com/services/cryopreservation/history-of-cryopreservation/>
- [7] <http://www.sciencealert.com/the-tardigrade-genome-has-been-sequenced-and-it-has-the-most-foreign-dna-of-any-animal>
- [8] Guidetti R, Altiero T, Bertolani R, Grazioso P and Rebecchi L. Survival of freezing by hydrated tardigrades in terrestrial and freshwater habitats
- [9] <http://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-13644259926&origin=inward&txGid=0#>
- [10] Peter Westh, Jeper Kristiansen and Aase Hvidt. Ice-nucleating activity in the freeze-tolerant tardigrade adorybiotus coronifer.
- [11] A.M. Rizzo, M. Negroni, T. Altiero, G. Montorfano, P. Corsetto, P. Berselli, B. Berra, R. Guidetti, L. Rebecchi. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*.
- [12] MAZUR, PETER. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247 (Cell Physiol. 16): C125-C142, 1984.
- [13] SAKAI, A., AND K. OTSUKA. Survival of plant tissue at super-low temperatures. V. An electron microscope study of ice in cortical cells cooled rapidly. *Plant Physiol.* 42: 1680-1694, 1967.
- [14] FARRANT, J., C. A. WALTER, H. LEE, AND L. E. MCGANN. The use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing. *Cryobiology* 14: 273-286, 1977.
- [15] MACKENZIE, A. P. Death of frozen yeast in the course of slow warming. In: *The Frozen Cell Ciba Foundation Symposium*, edited by G. E. W. Wolstenholme and Maevae O-Conner. London: Churchill, 1970, p. 89-96.
- [16] <http://www.britannica.com/technology/cryopreservation>
- [17] <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/31240.pdf>
- [18] HALMAGYI, A., DELIU, C. Cryopreservation of strawberry shoot tips by encapsulation-dehydration. *Institute of Biological Research. Romania*: 2006, p. 28-32.
- [19] <https://www.cnyfertility.com/2009/05/vitrification-for-embryos-and-eggs/>
- [20] <http://urvistahermosa.com/es/tratamientos-de-reproduccion-asistida/microinyeccion-espermatocitos-icsi/>



Laura Pérez Rodríguez, Adolfo Rodríguez Eguren, Carlos Saúco Carballo are second year Biotechnology students at Pablo de Olavide University.