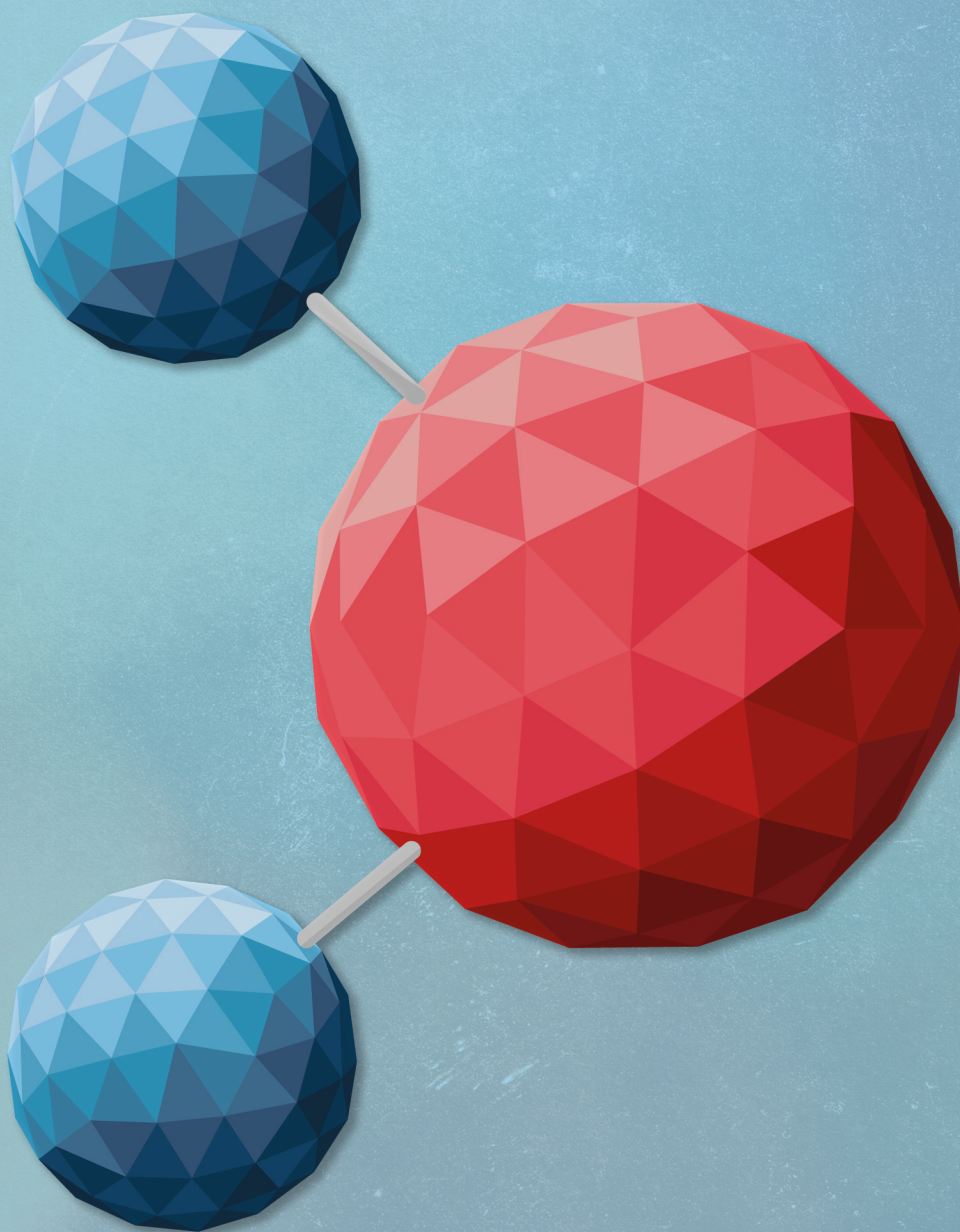


MOLEQLA

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

·Número 23·



Portada

Carmen Santisteban Trigo y María Manuela Valverde

Logotipo y Título de la revista

Juan Manuel García Arcos, Rafael Hoyos Manchado y Rafael Iigo

Rocío 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 Química: Patrick J. Merklng

MoleQla Forense: Paula Gómez Álvarez

MoleQla Energía: Juan José Gutiérrez Sevillano

MoleQla Ambiental: Ana Martín Calvo

MoleQla Celular: Guillermo López Lluch

MoleQla Patrimonio: María Pilar Ortiz Calderón

MoleQla Informática: Norberto Díaz Díaz

MoleQla Nanotecnología: Ana Paula Zaderenko Partida

MoleQla Farmacéutica: Matilde Revuelta González

Responsables de maquetación de las secciones que aparecen en este número

Cristina Guillén Mendoza

Juan Antonio del Castillo

Almudena García Sánchez

Alba Jiménez Díaz

Maquetador Global: Rafael Rastrero Prieto

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

Editores

Sofía Calero Díaz

Ana Paula Zaderenko Partida

Juan Antonio Anta Montalvo

Patrick J. Merklng



ISSN 2173-0903

Editado el 21 de Septiembre de 2016

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

EDITORIAL

Bienvenidos a este nuevo número de MoleQla en el que, como en los anteriores, nuestros autores nos traen lo mejor de la ciencia actual con carácter divulgativo. Además este número es muy especial, ya que en él nos despedimos de nuestra plataforma de Internet. Aunque las despedidas son siempre tristes, y más teniendo en cuenta que nuestra plataforma nos ha acompañado durante nada menos que seis años, en el número de invierno pondremos a vuestra disposición una nueva plataforma que ofrece muchas ventajas frente a la anterior, como lo es el facilitar el envío de artículos a nuestros autores, y su seguimiento.



Otro aspecto *interesante* de este número, es que se publica tras el Brexit y, como bien decía el celeberrimo autor y creador del Mundodisco, Terry Pratchett, “mejor que no toque vivir en *tiempos interesantes*”. Aunque nuestra revista, como sabéis, es de ciencias y no tratamos temas políticos, ocasionalmente merece la pena hacer un alto en el camino y una llamada a analizar la forma en que algunas decisiones políticas de peso pueden afectar a Las Ciencias. Resulta *interesante*, por ejemplo, que las encuestas anteriores al referéndum del Reino Unido (con tan inesperado resultado para sus convocantes) la inmensa mayoría de los científicos estuviesen en contra de la salida del Reino Unido de la Unión Europea. Las consecuencias del Brexit, que apenas han comenzado a perfilarse, preocupan hoy a la comunidad científica del Reino Unido, como se pone de manifiesto en un artículo publicado en la prestigiosa revista Nature el pasado 6 de octubre. Si el objetivo principal del Brexit va a ser limitar la inmigración, ¿qué implicaciones negativas tendrá sobre el tránsito de investigadores?, un hecho ampliamente deplorado por la mayoría de los investigadores y rectores de universidades del Reino Unido. Parece que en *tiempos interesantes* a veces nos alcanzan nuestros fantasmas...

Implicaciones políticas aparte, desde la redacción de MoleQla los editores os damos la bienvenida al nuevo curso, y os deseamos una feliz lectura.

ÍNDICE

1. MoleQla Nanotecnología

- 1.1 Uso de nanopartículas poliméricas para la eliminación de biopelículas bacterianas*
- 1.2 Uso de nanopartículas para la detección de enfermedades infecciosas en países en desarrollo*
- 1.3 Nanotecnología para el diagnóstico y tratamiento del Alzheimer*
- 1.4 Nanopartículas de curcumina: Estrategias y aplicaciones*
- 1.5 Nanoemulsiones y sus aplicaciones en cosmetica*
- 1.6 Dendrímeros y sus aplicaciones biomédicas*

2. MoleQla Química

- 2.1 THC, cannabis y el sistema endocannabinoide: un breve resumen*
- 2.2 Agentes antitumorales a partir de metabolitos de organismos marinos*
- 2.3 El papel del etileno en el proceso de maduración de los frutos*
- 2.4 Gaucher Disease and the future of medicine*
- 2.5 La teixobactina y el iChip: nuevas armas contra la Resistencia antibiótica*

3. MoleQla Patrimonio

- 3.1 La nanotecnología al servicio de los documentos*
- 3.2 Estudio in situ de material arqueológico mediante la técnica LIBS*
- 3.3 Canteras romanas en el sur de la península ibérica*
- 3.4 La gestión de riesgo de las colecciones de los museos*
- 3.5 ¿Por qué la música de Bach no suena igual?*
- 3.6 La fluorescencia visible inducida por radiación ultravioleta, apuntes para su uso e interpretación*

3.7 *El uso de nanopartículas de hidróxido de calcio para la consolidación de hueso y hueso fósil*

4. MoleQla Farmacéutica

4.1 *Nuevas terapias para el tratamiento de MEN2 derivado de mutaciones en el gen RET*

4.2 *Tratamientos actuales para la epidermodisplasia verruciforme*

4.3 *Nuevos tratamientos en Diabetes Mellitus: vías alternativas a la administración de insulina*

5. MoleQla Ambiental

5.1 *Bacterias productoras de polímeros para su utilización como plásticos biodegradables*

6. MoleQla Celular

6.1 *Los movimientos antivacunas. ¿Un peligro para la salud mundial?*

6.2 *Nuevas vacunas contra el virus del Ébola*

6.3 *Alergias vs intolerancias alimenticias*

6.4 *Las mascotas, ¿amigas del sistema inmune?*

6.5 *Xenotrasplantes, ¿el futuro?*

6.6 *Pancreas organogenesis, a focus on Pax4*

6.7 *Bioartificial pancreas development*

6.8 *Enfermedad granulomatosa crónica*

7. MoleQla Forense

7.1 *El fósforo blanco como arma química*

7.2 *La muerte dulce: intoxicación por monóxido de carbono*

8. MoleQla Energía

8.1 Producción de biodiesel a partir de algas

9. MoleQla Informática

9.1 Técnica de estimación de Puntos de Casos de Uso. Susana de la Calle Iglesias

9.2 Patrones de Diseño. Puiu Ionut Cosmin

Uso de nanopartículas poliméricas para la eliminación de biopelículas bacterianas

Pedro Jesús García Murillo

Resumen—Las infecciones por bacterias formadoras de biopelículas, como *Pseudomonas aeruginosa*, son una de las principales amenazas para pacientes hospitalizados y una de las causas más importantes de la aparición de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y de fibrosis quística. La relevancia de estas infecciones es mayor debido a la resistencia otorgada por la biopelícula frente a los antibióticos convencionales. Esto hace necesario el desarrollo de nuevas terapias y tratamientos frente a este tipo de microorganismos en la lucha contra las enfermedades infecciosas modernas. En este artículo veremos cómo podemos utilizar nanopartículas poliméricas de ácido poli (láctico-co-glicólico) como nueva herramienta frente a estas bacterias y a la biopelícula bacteriana como nueva diana para el tratamiento de estas enfermedades.

Palabras Claves— Biopelícula, Ciprofloxacino, DNasa I, Fibrosis quística, PLGA.



1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales causas de infecciones nosocomiales en el mundo y se suele asociar a pacientes de fibrosis quística y de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), siendo en estos pacientes la principal causa de morbilidad y mortalidad [1], [2].

La aparición de una infección crónica por *Pseudomonas* se debe a la formación por parte de este microorganismo de una estructura denominada biopelícula, constituida por agrupaciones de bacterias adheridas a una superficie y embebidas en una matriz polimérica [3]. Estas bacterias tienen más probabilidades de resistir a los tratamientos con antibióticos debido a que el fármaco no es capaz de difundir a través de la biopelícula [4]. Además, las bacterias en biopelículas presentan una fisiología diferente a la de células planctónicas, como por ejemplo, una tasa metabólica más baja, disminuyendo la eficacia de los antibióticos y aumentando las posibilidades de que aparezcan cepas resistentes a los antibióticos disponibles, lo que exige el desarrollo de nuevas líneas terapéuticas [5], [6].

Nuevos dispositivos, como las nanopartículas poliméricas, han sido estudiados para el tratamiento de infecciones bacterianas por su capacidad de encapsular y liberar sustancias de forma sostenida [7].

2. IMPORTANCIA DE LAS BIOPELÍCULAS

El crecimiento en biopelículas de los microorganismos ha sido ampliamente estudiado y, en particular, en *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con infección broncopulmonar. La matriz de la biopelícula está compuesta principalmente por proteínas, cadenas de polisacáridos y ADN extracelular (eADN) [8].

Esta estructura confiere una resistencia a las bacterias frente a antimicrobianos, permitiendo que se produzcan episodios recurrentes tras el tratamiento debido a una

erradicación incompleta de la infección. Esta resistencia se produce por varias causas: a) la barrera de difusión que proporciona resistencia a la penetración de los antimicrobianos a través de la matriz de la biopelícula, b) el lento crecimiento de las bacterias en las biopelículas por la limitación de nutrientes que dificulta la acción de los antimicrobianos y c) la activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de fenotipos que favorecen el desarrollo de mutantes resistentes [8].

Por ello, se ha empezado a pensar que, además de la célula bacteriana, la matriz de la biopelícula puede ser una posible diana para el tratamiento de infecciones de bacterias formadoras de biopelículas, ya que la sustancia extracelular de la biopelícula se encuentra muy expuesta y a menudo presenta una estructura porosa [9], [10].

Algunos estudios recientes han demostrado que el eADN es clave para la formación, estabilidad estructural y patogenicidad de la biopelícula, al actuar como agente de reticulación de la matriz y como quelante de los agentes antimicrobianos catiónicos, lo que puede provocar la aparición de resistencias a los antibióticos [10]. Es por ello que se ha producido un incremento de los tratamientos con desoxirribonucleasa (DNasa), en forma de aerosoles, donde se ha observado que la administración conjunta de DNasa mejora la actividad de algunos antibióticos reduciendo la formación de biopelículas [11].

Estas son algunas de las causas por las cuales se están estudiando nuevos dispositivos capaces, no sólo de controlar la liberación de antibiótico, sino también de interactuar con la biopelícula con el objetivo de dañar de manera directa la matriz extracelular, y en particular su eADN, en el tratamiento de infecciones persistentes, como las asociadas a fibrosis quística.

3. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Entre las nuevas estrategias para el tratamiento de infecciones bacterianas bajo estudio, tenemos a las nanopartículas poliméricas (NPs) biodegradables constituidas

por ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), con el fin de usarlas como vehículos de administración de fármacos. Esto se debe a que estas nanopartículas permiten la encapsulación de varios compuestos con distintas propiedades químicas y físicas y a que el perfil de degradación del PLGA puede ajustarse variando la relación entre ácido láctico y glicólico, lo que permite controlar la liberación del fármaco cargado [12]. Además, el PLGA ya ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para varios dispositivos biomédicos, lo que facilita la llegada a la práctica clínica de estas NPs de PLGA cargadas con un fármaco.

Por este motivo, se han llevado a cabo ensayos en los que se han estudiado NPs de PLGA cargadas con ciprofloxacino (CPX), un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas, y recubiertas con DNasa I, con el propósito de combinar una liberación controlada del fármaco con la capacidad de destruir la matriz de la biopelícula [13]. Al mismo tiempo, se sintetizaron otras NPs con distintas composiciones para comparar sus propiedades físicas, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1
COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LAS DISTINTAS NPs

	PLGA-CPX	PLGA-PL-CPX	PLGA-PL-DNasa I	PLGA-PL-CPX-DNasa I
Recubrimiento	-	Poli-lisina	Poli-lisina DNasa I	Poli-lisina DNasa I
Actividad DNasa I ($\mu\text{g ADN/mg NPs/h}$)	-	-	32.0	26.2
%op/p de CPX	0.26	0.24	-	0.17
Tamaño (nm)	213.6	272.5	265.0	251.9
Índice de polidispersión	0.085	0.101	0.099	0.122
Potencial Zeta (mV)	-12.9 ± 11.20	$+33.5 \pm 5.99$	$+30.8 \pm 0.70$	$+28.9 \pm 1.43$

En los ensayos de liberación in vitro del CPX encapsulado en las NPs, se comprobó cómo después de la primera hora, se liberaba entre el 40 y el 50% de la carga total de CPX de todas las NPs pero que posteriormente no se comportaban de la misma manera, ya que aquellas que no estaban recubiertas con poli-lisina (PL) liberaban su contenido total de fármaco al cabo de 12h mientras que las NPs que estaban recubiertas con PL y con PL-DNasa I, mostraron una liberación más controlada y constante del fármaco restante, habiendo liberado a las 12h respectivamente el 60 y el 80% del contenido de CPX (Figura 1) [13].

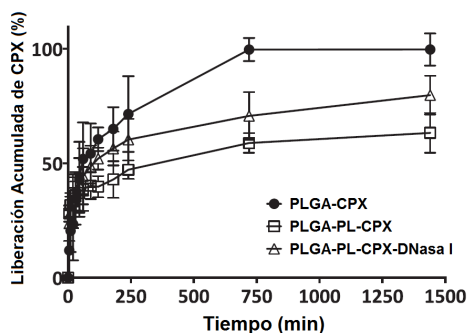


Fig. 1. Porcentaje de CPX liberado respecto al tiempo [13].

También se ha estudiado la actividad antibacteriana de estas NPs cargadas con CPX frente a *P. aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), utilizando como control CPX no encapsulado, que sugirieron una buena actividad antibacteriana de las NPs frente a *P. aeruginosa*. En base a los resultados, se estudió la capacidad de las NPs para inhibir la formación de biopelículas mediante el uso de "peg lids" y, como puede verse en la Figura 2a, para concentraciones tan bajas de CPX cargado como 0.0156 $\mu\text{g/ml}$, la formación de la biopelícula disminuyó en más del 80%, llegando a valores del 100% a concentraciones de CPX mayores de 0.125 $\mu\text{g/ml}$ [13].

En otro ensayo se estudió la actividad anti-biopelícula de las diferentes NPs cargadas con CPX frente a biopelículas de *P. aeruginosa* formadas tras 48h, usando de nuevo "peg lids", donde todas las NPs mostraron una inhibición de más del 50% de la biopelícula en las concentraciones más altas de CPX (0.5 $\mu\text{g/ml}$) pero pudo observarse una disminución drástica de la biopelícula del 95% a concentraciones de CPX de 0.0078 $\mu\text{g/ml}$ al usar NPs de PLGA recubiertas con PL y DNasa I, mostrando así la mejor actividad anti-biopelícula, tal y como se observa en la Figura 2b.

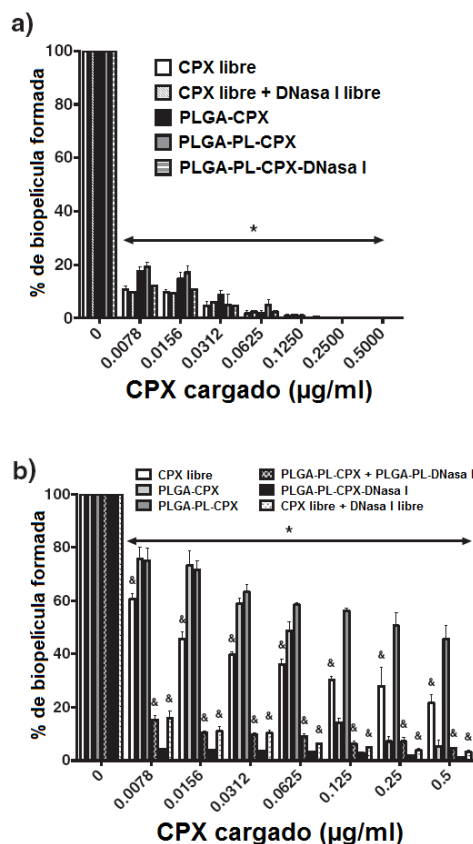


Fig. 2. (a) Representación del porcentaje de biopelícula formada en presencia de concentraciones variables de CPX encapsulado. (b) Representación del porcentaje de biopelícula no destruida en presencia de concentraciones variables de CPX encapsulado [13].

A estos estudios se le sumaron estudios de citotoxicidad, que indicaron ausencia de efecto citotóxico de todas las NPs utilizadas, y un estudio de la capacidad de elimi-

nación de biopelícula formada tras 48h con administraciones repetidas de NPs cargadas con CPX (1 dosis/día, durante tres días consecutivos). En este último, se observó que la actividad anti-biopelícula más alta la presentaban las NPs de PLGA-PL-CPX-DNasa I, las cuales eran capaces de eliminar más del 95% de la biopelícula en el segundo día de tratamiento a concentraciones de CPX de 0.0156 µg/ml, llegando incluso a eliminar el 99,8% de la biopelícula a concentraciones de CPX de 0.25 µg/ml [13].

4. CONCLUSIONES

Como se puede observar por los distintos resultados obtenidos tras los diversos estudios con NPs de PLGA cargadas con CPX y recubiertas con PL y DNasa I, parece ser que podríamos estar hablando de la próxima generación de fármacos empleados para el tratamiento de este tipo de infecciones, ya que estos son muy prometedores. Sin embargo, aún queda camino por recorrer para llegar a esa meta, ya que aún es necesario refinar los parámetros de fabricación de estas NPs para mejorar la eficiencia de la encapsulación de CPX, además de realizar las validaciones en modelos in vivo necesarias. Aún así estas NPs podrían representar un gran paso hacia adelante en el tratamiento de infecciones por bacterias formadoras de biopelículas.

REFERENCIAS

- [1] J.B. Lyczak, C.L. Cannon and G.B. Pier, "Lung infections associated with cystic fibrosis," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 15, no. 2, pp. 194-222, Apr 2002, doi:10.1128/CMR.15.2.194-222.2002.
- [2] K. Ito and P.J. Barnes, "COPD as a disease of accelerated lung aging," *Chest*, vol. 135, no. 1, pp. 173-180, Jan 2009, doi:10.1378/chest.08-1419.
- [3] M.R. Parsek and P.K. Singh, "Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 57, pp. 677-701, Oct 2003, doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090720.
- [4] J.W. Costerton, P.S. Stewart and E.P. Greenberg, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322, May 1999, doi:10.1126/science.284.5418.1318.
- [5] P.S. Stewart and M.J. Franklín, "Physiological heterogeneity in biofilms," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, pp. 199-210, Mar 2008, doi:10.1038/nrmicro1838.
- [6] B. Spellberg, R. Guidos, D. Gilbert, J. Bradley, H.W. Boucher, W.M. Scheld, J.G. Bartlett, J. Edwards Jr. and Infectious Diseases Society of America, "The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 46, no. 2, pp. 155-164, Jan 2008, doi:10.1086/524891.
- [7] R. Kalluru, F. Fenaroli, D. Westmoreland, L. Ulanova, A. Maleki, N. Roos, M. Paulsen, Madsen, G. Koster, W. Egge-Jacobsen, S. Wilson, H. Roberg-Larsen, G.K. Khuller, A. Singh, B. Nyström and G. Griffiths, "Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phagolysosomes," *Journal of Cell Science*, vol. 126, no. 14, pp. 3043-3054, May 2013, doi:10.1242/jcs.121814.
- [8] R. Cantón, A. Fernández, E. Gómez, R. Del Campo and M.A. Meseguer, "Infección bronquial crónica: el problema de *Pseudomonas aeruginosa*," *Arch. Bronconeumol.*, vol. 47, no. 6, pp. 8-13, Jun 2011, doi:10.1016/S0300-2896(11)70029-1.
- [9] E.S. Gloag, L. Turnbull, A. Huang, P. Valotton, H. Wang, L.M. Nolan, L. Mililli, C. Hunt, J. Lu, S.R. Osvath, L.G. Monahan, R. Cavaliere, I.G. Charles, M.P. Wand, M.L. Gee, R. Prabhakar and C.B. Whitchurch, "Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, vol. 110, no. 28, pp. 11541-11546, Jul 2013, doi:10.1073/pnas.1218898110.
- [10] M. Okshevsky and R.L. Meyer, "The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms," *Critical Reviews in Microbiology*, vol.41, no. 3, pp. 341-352, 2015, doi:10.3109/1040841X.2013.841639.
- [11] M. Alipour, Z.E. Suntres, A.Omri, "Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 64, no. 2, pp. 317-325, Jul 2009, doi: 10.1093/jac/dkp165.
- [12] F. Mohamed and C.F. van der Walle, "Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 1, pp. 71-87, Jan 2008, doi:10.1002/jps.21082.
- [13] A. Baelo, R. Levato, E. Julián, A. Crespo, J. Astola, J. Gavaldà, E. Engel, M.A. Mateos-Timoneda and E. Torrents, "Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections," *Journal of Controlled Release*, vol.209, pp. 150-158, Jul 2015, doi:10.1016/j.jconrel.2015.04.028



Pedro Jesús García Murillo recibió el Grado en Farmacia por la Universidad de Sevilla en 2015 y un curso certificado por el MIT sobre "Ensayos para el estudio de los mecanismos de replicación y reparación del ADN". Actualmente está realizando el primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.

Uso de nanopartículas para la detección de enfermedades infecciosas en países en desarrollo

Cristina Cerrada Romero

Resumen— Las enfermedades infecciosas suponen una gran amenaza para el ser humano, especialmente en países en desarrollo. Esto hace necesario el desarrollo de dispositivos rentables, portátiles y con un sistema de detección muy sensible, rápido, preciso, que pueda diferenciar entre distintos patógenos. Esta es un área en la que la nanotecnología podría desempeñar un papel de liderazgo a través del uso de quantum dots y nanoestructuras metálicas, entre otras, y su integración con las tecnologías “lab on a chip”, representando unas alternativas diagnósticas prometedoras que ya están en desarrollo. Sin embargo, hay aún muchos retos que deben abordarse antes de que el diagnóstico basado en nanotecnología esté realmente listo para su uso en países en desarrollo.

Palabras Claves— Enfermedades infecciosas, Tests de diagnóstico, Nanotecnología.

1. INTRODUCCIÓN

Una enfermedad infecciosa es una enfermedad clínicamente evidente resultante de la presencia de un agente patogénico que puede ser un virus, bacteria, hongo o parásito patogénico.

Estas enfermedades suponen una gran amenaza, ya que según datos extraídos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se les puede atribuir más de la mitad de las muertes que ocurren en todo el mundo, especialmente en países en desarrollo [1]. Ante la amenaza planteada por estas enfermedades, una rápida detección tiene un enorme impacto en el éxito de las estrategias para la localización, control y erradicación de la enfermedad. El diagnóstico de una enfermedad infecciosa implica la detección del agente infeccioso, ya sea directa o indirectamente. Ha habido grandes avances en las técnicas de diagnóstico, las cuales incluyen microscopía, cultivo tisular, inmunoensayos de flujo lateral (tiras reactivas o pruebas inmunocromatográficas) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). La reciente técnica “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR) tiene un umbral de detección más bajo que las técnicas anteriores y puede diferenciar selectivamente cepas de patógenos; sin embargo, está limitada por los mismos problemas que la mayoría de técnicas de diagnóstico de uso común (velocidad de análisis, necesidad de personal cualificado, y la incapacidad para detectar múltiples cepas de agentes infecciosos simultáneamente) y tiene otros obstáculos tales como la influencia de la contaminación en el resultado medido y tiempos de análisis de varias horas [2]. Estas tecnologías de diagnóstico son comúnmente usadas en países desarrollados pero, a menudo son poco adecuadas para países en desarrollo donde las enfermedades infecciosas son una fuente importante de morbilidad y mortalidad, y donde la disponibilidad de servicios clínicos y de laboratorio suele ser limitada. En

consecuencia, el dispositivo ideal para este tipo de países tendría que ser una solución rentable, portátil, con un sistema de detección muy sensible, preciso y que pudiera diferenciar entre distintos patógenos.

En este contexto los nanosensores ofrecen un gran potencial en la introducción de métodos de diagnóstico rápidos, fiables y fáciles de usar, que podrían beneficiar a estos países en un futuro cercano.

2. NANODIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

El nanodiagnóstico implica el uso de la nanotecnología en diagnósticos clínicos. La gran superficie de los nanomateriales permite la unión de un gran número de moléculas diana-específicas de interés, facilitando la detección ultrasensible. Esta capacidad hace que sea posible el diagnóstico a nivel molecular y celular. Debido a la alta sensibilidad, la nanotecnología permite la detección de microorganismos o analitos moleculares que posean dianas en patógenos específicos. Además, las propiedades únicas de los nanomateriales podrían permitir una detección rápida y en tiempo real de los agentes patógenos. Por otra parte, se requieren relativamente pequeños volúmenes de muestra para las pruebas. Todas estas características atractivas tendrían un impacto positivo en la rentabilidad para la implementación de la nanotecnología para diagnosis de enfermedades infecciosas, especialmente en países en desarrollo [3].

Para aplicaciones biológicas las nanopartículas, debido a sus características de superficie, requieren de una modificación superficial para mejorar su estabilidad en agua y su biocompatibilidad, y la obtención de unos grupos funcionales apropiados en superficie que permitan la bioconjugación. Además de proporcionar un sitio para la conjugación de biomoléculas, los grupos funcionales también juegan un papel crucial en el control de la estabilidad co-

loidal de la nanopartícula (NP). Hasta la fecha, NPs de diversos tipos han sido estudiadas y usadas; así NPs fluorescentes (quantum dots (QD), NPs cargada de tinte), NPs magnéticas y NPs metálicas (NPs oro y plata) han sido utilizadas con éxito para escanear, rastrear y detectar una gran variedad de microorganismos infecciosos [3].

2.1. Diagnósticos simples basados en nanotecnología

Los nanomateriales se han utilizado para construir sensores en tres plataformas diferentes para el diagnóstico simple de enfermedades infecciosas: 1) etiquetas de nanopartículas en ensayos TIC (Figura 1), 2) ensayos de agregación de nanopartículas y 3) etiquetas de nanopartículas de patógenos completos. Estas pruebas se basan en los mismos conceptos que la técnica ELISA, y detectan anticuerpos en la sangre u otros fluidos corporales. Los ensayos tradicionales de flujo lateral se basan en la detección colorimétrica, que es visible para el ojo humano, usando colorantes desnudos, partículas de látex, o pequeñas nanopartículas de oro como agentes de contraste. Los límites de detección varían, y dependen de las especies de patógenos. Además la disponibilidad de antígenos bien caracterizados varía de una especie de patógeno a otra. Esto destaca la importancia de la caracterización de dianas proteicas y de ácidos nucleicos en la mejora de la especificidad de diagnóstico de la nanotecnología. Las NPs metálicas presentan fuertes bandas de excitación en el espectro visible conocidas como resonancia de plasmón; esta absorción procede de la excitación colectiva de los electrones de conducción o plasmón de superficie. Los plasmones de superficie son fácilmente excitables por radiación visible dando lugar a interesantes fenómenos ópticos relacionados con la respuesta electromagnética del metal entre los que se encuentran: una absorción muy intensa de radiación, una dispersión Rayleigh resonante y la amplificación del campo eléctrico en la superficie de la molécula, responsable de las intensas señales observadas en espectroscopia en superficie. Así, las NPs de oro y plata tienen una fuerte absorción óptica que presenta desplazamientos hacia el rojo seguidos de agregación, y proporcionan una señal óptica fácilmente visible. Estas estrategias de detección normalmente se basan en la interacción entre anticuerpos unidos a nanoestructuras y las moléculas diana. La molécula diana actúa como un puente entre varias nanopartículas, y esta interacción resulta en un cambio, medible, en la señal óptica de las nanopartículas debido a la agregación [2].

Para la detección genómica, las nanopartículas metálicas pueden estar recubiertas con secuencias específicas de nucleótidos, que son complementarios a una secuencia diana. En presencia de la secuencia diana las secuencias complementarias hibridan, uniéndose o agregándose varias partículas. La interacción de las partículas produce un cambio colorimétrico en la suspensión, que es reversible si esta se calienta para interrumpir las interacciones de nucleótidos. En el caso del oro, el color de la suspensión que contiene agregados de nanopartículas cambia de rojo a azul debido a los cambios en los plasmones de superficie y las propiedades de dispersión de las partículas que

interaccionan [2].

El marcaje directo y la detección de marcadores de patógenos también es un método de detección de agentes infecciosos patógenos bien caracterizado. Por ejemplo se han utilizado nanocables de sílice cargados con boro para detectar influenza A. Para esto se han unido anticuerpos específicos para el virus a los nanocables y analizado el cambio en la conductividad de los nanocables después de la interacción antígeno-anticuerpo. Se observaron cambios medibles en la conducción en concentraciones virales de 100 U/L. Para demostrar la especificidad, se comprobó que el nanocable recubierto de anticuerpos no producía señal medible cuando era incubado con adenovirus o paramyxovirus. Aunque estos esquemas de detección requieren equipos de laboratorio tales como fluorímetros o espectrofotómetros, no requieren personal altamente capacitado, como patólogos o instalaciones de riesgo biológico nivel 3. También cabe destacar la importancia de la detección múltiple de patógenos y la capacidad de diferenciar las infecciones relacionadas o similares.

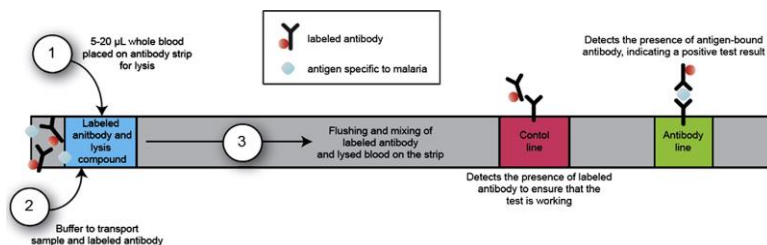


Fig. 1. Método Inmunocromatográfico para kits de prueba rápidos.

Este tipo de prueba diagnóstica de flujo lateral es ya usada como un test rápido para malaria. En este la sangre del paciente se coloca en una tira de anticuerpo y lisis (1), donde los anticuerpos marcados contactan con el antígeno en la sangre si este está presente. (2) Se añade el tampón que transporta el anticuerpo marcado a las líneas de anticuerpos adicionales (4) y (5). La línea (4) es una línea de control, para asegurar que la prueba está funcionando, y la línea (5) contiene un anticuerpo específico para el antígeno diana, creándose un ensayo de tipo sándwich si el antígeno está presente. La observación visual de dos líneas indica un test positivo [2].

2.2. Detección múltiple con nanodiagnósticos

Mientras que las plataformas de diagnósticos simples basados en la nanotecnología tienen una sensibilidad comparable a los diagnósticos estándar de las enfermedades infecciosas, la capacidad de un escaneo simultáneo para múltiples patógenos o marcadores es limitada. Actualmente, un foco principal en la investigación en nanotecnología es el desarrollo de sistemas de ensayo múltiples que puedan detectar una multitud de moléculas, virus enteros o bacterias simultáneamente. Un ejemplo de estos sistemas son los "códigos de barra"; hay muchos tipos de códigos de barras disponibles, algunos de ellos son los códigos de barras de puntos cuánticos y el ensayo de bio-código de barras genómico. El principio de diagnóstico es similar para todos los códigos de barras basa-

dos en nanotecnología. Los quantum dots semiconductores (QDs) son marcadores brillantes, fotoestables y fluorescentes que han sido usados en esquemas proteómicos y de detección de ácidos nucleicos. Los códigos de barra QD consisten generalmente en microesferas de poliestirano que contienen diferentes ratios de proporciones de quantum dots fluorescentes, con una única etiqueta de color correspondiente a un particular antígeno diana u oligonucleótido. El evento de detección positiva sucede cuando hay detección simultánea de la señal del código de barras y de un fluoróforo secundario. La "entidad biológica" a detectar puede ser gen, proteína, o todo agente patógeno [2].

En un ensayo se desarrollaron códigos de barras QD para el multiplexado y detección de biomarcadores de alto rendimiento que codifican para un grupo de enfermedades infecciosas transmitidas por la sangre (hepatitis B, hepatitis C y VIH). Usando dos colores, ZnS tapa CdSe quantum dots, los investigadores crearon 3 códigos de barras que se conjugaron con biomarcadores de antígenos de superficie del patógeno de hepatitis B para el VHB, proteína 4 no estructural para VHC y glicoproteína 41 para VIH. Los códigos de barras QD se incubaron en suero humano enriquecido con los anticuerpos correspondientes. Durante una incubación posterior con un fluoróforoanticuerpo que conjuga para proporcionar un pico de señal de detección de fluorescencia en ~520 nm se formaron complejos de ensayo Sandwich. Es posible realizar el ensayo completo en 1 h y además este rápido esquema de detección multiplexada exhibe umbrales de detección en el rango de 10^{-10} M a 10^{-12} M con un volumen de muestra de ~100 μ L. El sistema utilizó un dispositivo de microfluidos basado en un chip para lectura, y actualmente está siendo convertido en un sistema de diagnóstico portátil.

También han sido diseñados ensayos basados en chips heterogéneos para una detección molecular multiplexada. De esta forma, se diseñó una técnica de diagnóstico molecular basada en un chip, usando nanopartículas de oro y magnéticas, conocida como ensayo de amplificación basado en código de barra (BCA). Esta técnica tiene un umbral de detección de 10^{-21} M, que es equivalente a 10 copias de oligonucleótidos. Sin embargo, este método requiere generalmente el uso de detectores, como el sistema Verigine, que miden la luz dispersada a partir de muestras de nanopartículas. Tales sistemas son caros, usan complejos instrumentos de sobremesa por lo que se hace necesario un mayor desarrollo para reducir estos dispositivos o el uso de sistemas más simples para desarrollar aplicaciones mundiales. También, aunque los ensayos BCA basados en nanopartículas de oro proporcionan niveles de sensibilidad similares a los conseguidos con la técnica PCR, el tiempo requerido para un único ensayo es aproximadamente de 6 h. Debido a esto, este tipo de ensayo todavía enfrenta desafíos prácticos antes de que pueda ser desarrollado para diagnósticos rápidos. En general, estos sistemas de detección multiplexados basados en nanopartículas tienen un gran potencial pero son todavía relativamente complejos y requieren un considerable equipamiento en el laboratorio [2].

2.3 Plataformas avanzadas y sistemas de lectura

La reducción de la complejidad del sistema y la capacidad de incorporar el esquema de detección en un dispositivo cerrado en el que una muestra puede ser colocada son áreas importantes para la futura investigación. El potencial de las tecnologías "lab on a chip" (LOC) encaja con estos requisitos.

Se trata de chips en los que se pueden construir múltiples funciones para permitir la preparación de ensayos y automatización. Estos sistemas LOC tienen muchas ventajas, incluyendo la reducción del consumo de reactivos, el uso de volúmenes de muestras más pequeños, la reducida producción de residuos debido a la miniaturización, el análisis de corto tiempo y, lo más importante, el potencial para la integración en el sistema de instrumentos de detección para crear dispositivos portátiles. Las técnicas LOC proporcionan una tecnología de transición crítica y pueden proporcionar una forma ideal de proveer diagnósticos basándonos en la nanotecnología. Un ensayo realizado empleaba códigos de barra quantum dot en un dispositivo LOC como una plataforma para la detección múltiple y simultánea de antígenos para VIH, VHB y VHC en sueros humanos. Las nanopartículas de oro y nanopartículas magnéticas han sido también usadas; estas últimas ya sea para proporcionar un área de gran superficie y un control magnético flexible, o como etiqueta secundaria para la detección con sensores magnetoresistentes. A pesar de los avances significativos, la mayoría de los ensayos LOC todavía dependen de instrumentos de sobremesa voluminosos y costosos para la detección de señales, tales como microscopia de fluorescencia y espectrofotometría. En algunos estudios, se realizaron partes del ensayo utilizando métodos convencionales de laboratorio, como el pretratamiento de la muestra para el análisis de ácidos nucleicos.

Aunque el desarrollo de un dispositivo LOC autónomo y portátil es una tarea difícil, se ha logrado llevar a cabo algunos estudios con dispositivos totalmente o semi-integrados. Por ejemplo se ha desarrollado una prueba de inmunoensayo portátil y de bajo coste, con canales de microfluidos rectos [2].

3. CONCLUSIONES

Se necesitan tecnologías innovadoras para llevar a cabo nuevos avances que permitan la detección rápida de la enfermedad y consientan la detección de varios patógenos de forma simultánea; un área en la que la nanotecnología podría desempeñar un papel de liderazgo a través del uso de quantum dots, nanoestructuras metálicas, entre otras, y su integración con las tecnologías de "lab on a chip", representando unas alternativas diagnósticas prometedoras que ya están en desarrollo. Sin embargo, quedan muchos retos que deben abordarse antes de que el diagnóstico basado en la nanotecnología esté realmente listo para su uso en países en desarrollo. Estos retos incluyen el descubrimiento y la selección de antígenos eficaces, y anticuerpos con dianas de nucleótidos, necesarios para mejorar la especificidad de las plataformas de detec-

ción basados en la nanotecnología y que permitan diferenciar entre distintas cepas. Además, deben continuar los esfuerzos para la creación de plataformas de detección miniaturizadas. Para la detección genómica, se necesitan estrategias para simplificar la purificación y aislar genes de interés. Aunque los avances en nanotecnología no se han aplicado plenamente para la detección de enfermedades infecciosas en países en desarrollo, la nanotecnología potencialmente puede abordar muchos de los retos señalados por la Organización Mundial de la Salud para la prestación de un rápido y eficaz diagnóstico.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud. "Estadísticas sanitarias mundiales 2014", 2014
- [2] T.S. Hauck, S. Giri, Y. Gao, and W.C.W. Chan, "Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, no. 4, pp. 438-448, Nov 2009, doi:10.1016/j.addr.2009.11.015.
- [3] P. Tallury, A. Malhotra, L.M. Byrne, and S. Santra, 2010, "Nanobioimaging and sensing of infectious diseases," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 4, pp. 424-437, Nov 2009, doi:10.1016/j.addr.2009.11.014



Cristina Cerrada Romero recibió el título de Graduada en Biología en 2014 por la Universidad de Sevilla, donde fue alumna interna en el Departamento de Biología celular durante el curso 2012/2013. Actualmente es estudiante de primer curso del Master Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide Sevilla en el curso 2014/2015.

Nanotecnología para el diagnóstico y tratamiento del Alzheimer

Manuel Velasco Gomariz

Resumen—El Alzheimer es el tipo más común de demencia y cursa con una muerte neuronal que provoca una degeneración de las funciones cognitivas, lo que puede causar la muerte en última instancia. Por esta razón, la ciencia ha estado estudiando los mecanismos moleculares que provocan esta pérdida neuronal y se han intentado desarrollar diversas estrategias que consigan retrasar los síntomas o puedan incluso curar a los pacientes. Uno de los principales problemas con los que se encuentran todos estos tratamientos es la impermeabilidad de la barrera hematoencefálica, que impide que los fármacos puedan llegar al cerebro y ejercer su función terapéutica. Para solventar este problema, la nanotecnología puede ser un gran aliado, ya que el pequeño tamaño de las nanopartículas permite que puedan atravesar esta membrana, y con ello dirigir estos fármacos a su lugar de acción. Además, las nanopartículas también pueden ser muy interesantes para mejorar el diagnóstico de esta enfermedad y así poder detectarla en sus etapas tempranas. En este artículo, se revisarán una serie de estrategias que utilizan la nanotecnología para mejorar el tratamiento y diagnóstico de esta dolencia.

Palabras Claves— Alzheimer, Barrera hematoencefálica, Diagnóstico, Estrategias terapéuticas, Nanotecnología.

1. INTRODUCCIÓN

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la pérdida progresiva de memoria y de las funciones cognitivas debido a la muerte neuronal. Su incidencia es muy elevada y aumenta con la edad, afectando a un 5-10% de la población menor de 65 años y de un 40-50% de personas mayores de 85 años. La alta incidencia de esta dolencia y la gravedad de sus síntomas han impulsado el desarrollo de diversas estrategias terapéuticas para intentar tratarla, pero a día de hoy no existe ningún tratamiento efectivo para estos pacientes.

El estudio de esta enfermedad ha mostrado los mecanismos tan complejos que la guían y también ha permitido que el desarrollo de las terapias pueda ser enfocado desde varios campos de la ciencia. Sin embargo, el Alzheimer presenta dos problemas que han de ser solucionados: en primer lugar, aún se desconocen muchos de los mecanismos que lo rigen; y en segundo lugar, la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés *blood-brain barrier*) presenta una enorme impermeabilidad, lo que dificulta la liberación de fármacos desde la sangre hasta el cerebro [1]. Para superar este segundo desafío, los sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas pueden resultar de gran interés, ya que gracias a las ventajas que presentan estas partículas se puede aumentar la eficacia terapéutica de los fármacos [1]. Además de para el tratamiento, la nanotecnología también puede ser de ayuda para conseguir realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, y así poder actuar para impedir el desarrollo de la misma [2].

A pesar de que no se conocen completamente los mecanismos moleculares de esta dolencia, se han propuesto varias hipótesis sobre la misma y se han ido desarrollado fármacos que interfieren con estos procesos. Algunas de estas hipótesis son: la hipótesis de la cascada del péptido

β -amiloide, la de la proteína tau, la colinérgica, la del estrés oxidativo y la de la transición metálica. En base a todas ellas se han ido estudiando distintas estrategias terapéuticas, arrojando algunas de ellas resultados prometedores gracias, en gran medida, al uso que hacen de la nanotecnología [1].

2. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL ALZHEIMER CON EL USO DE NANOTECNOLOGÍA

En este apartado se van a nombrar una serie de estrategias terapéuticas que están en investigación para el Alzheimer en las que nanotecnología ha estado implicada.

2.1. Terapias basadas en el péptido β -amiloide como diana:

La acumulación progresiva del péptido β -amiloide se considera el mecanismo principal del Alzheimer, por lo que las estrategias terapéuticas basadas en reducir la producción y agregación del péptido, así como conseguir su eliminación son de gran interés.

El péptido se forma debido al procesamiento proteolítico anormal de la proteína precursora amiloide (PPA) por acción de la β -secretasa (BACE1) y la γ -secretasa [1]. Por tanto, el desarrollo de inhibidores de estas secretasas puede ayudar a modular la producción del péptido β -amiloide. Una de las estrategias desarrolladas es el uso de ARNs de interferencia pequeños (siRNA, del inglés *small interfering RNA*), que acoplados a exosomas modificados son capaces de silenciar a la enzima BACE1 en el cerebro, lo que ha permitido evitar la producción del péptido β -amiloide [3].

Otra estrategia de este grupo se basa en bloquear la agregación del péptido amiloide gracias al uso de peptidomiméticos (estructuras capaces de reemplazar a un

péptido en sus interacciones con receptores y enzimas), que contienen la secuencia de aminoácidos 16-20 del péptido amiloide [1]. El problema que presentan los péptidos es su rápida degradación en sangre, lo cual se solventa con los peptidomiméticos, más resistentes a la hidrólisis. Sin embargo, su pobre permeabilidad a la BBB llevó a que se combinaran con polioxometalato para conformar nanoesferas híbridas polioxometalato-péptido (POM@P) mediante un proceso de autoensamblaje, con lo que se consiguió inhibir la agregación del péptido β -amiloide *in vitro* [4]. Por otra parte, la curcumina (polifenol obtenido de los rizomas de la planta *Curcuma longa*) se ha visto que es capaz de prevenir la agregación del péptido β -amiloide, y provocar la desagregación de las placas. Como su biodisponibilidad mediante administración oral es muy baja, se han buscado estrategias para conseguir aumentarla, como la encapsulación. Así, se ha conseguido encapsularla en micelas poliméricas de polietilenglicol-ácido poliláctico (PEG-PLA), y secarla en frío con ciclodextrina hasta conseguir nanopartículas secas de curcumina de menos de 80 nanómetros, que mostraron buenos resultados y presentaban una alta estabilidad [5].

En cuanto al aclarado de las placas que se forman en el cerebro, una de las estrategias más recientes es el uso de nanopartículas basadas en lipoproteínas de alta densidad reconstituidas con apolipoproteína E3 (ApoE3). Estas nanopartículas están preparadas por autoensamblaje de ApoE3 y son capaces de atravesar la BBB, fomentando el aclaramiento de las placas gracias al componente ApoE3. Esta estrategia hizo posible que ratones modelo para esta enfermedad mostraran una mejora en la recuperación de la memoria [6].

Todas estas estrategias pueden ser mucho más efectivas si se utilizan anticuerpos capaces de dirigir las nanopartículas hasta las placas de β -amiloide. Un ejemplo de esto es el uso de nanopartículas que incorporan los péptidos TGN y QSH para la permeabilización de BBB y el reconocimiento de las placas respectivamente [7].

2.2. Terapias basadas en la hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica se basa en la idea de que el progreso de la enfermedad provoca una degeneración de las neuronas colinérgicas, y por tanto, se produce una pérdida de la neurotransmisión colinérgica, lo que provoca la pérdida de la conexión en el sistema nervioso central. Varios inhibidores de la colinesterasa (enzima implicada en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina) se han aprobado para su uso comercial. Sin embargo, la baja permeabilidad de la BBB y su baja eficacia ponen en duda su efectividad. Estos problemas pueden ser solventados gracias a la nanotecnología [1]. Un ejemplo es un estudio en el que se usan liposomas asociados a rivastigmina (inhibidor de la colinesterasa) que es capaz de aumentar la biodisponibilidad de este compuesto en el sistema nervioso central [8].

2.3. Terapias con antioxidantes

La fosforilación oxidativa origina como subproductos especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), que provocan disfunción mitocondrial. El

estrés oxidativo es un factor patológico clave en la enfermedad del Alzheimer, ya que la sobreproducción de ROS provoca la interacción entre las placas de amiloide y las proteínas de la mitocondria, promoviendo la muerte neuronal. Por tanto, las estrategias enfocadas a reducir este daño oxidativo son de gran interés para el tratamiento de esta dolencia en sus etapas tempranas. En una de las estrategias más recientes, se han desarrollado nanopartículas de dióxido de cerio conjugadas a trifenilfosfonio (las dirige hasta la mitocondria) que suprimen la muerte neuronal. Estas nanopartículas actúan como basureros reciclables de ROS capaces de unir átomos de oxígeno y producir intercambios entre los estados oxidativos Ce^{+3} (reducido) y Ce^{+4} (oxidado) en su superficie, lo que disminuye el estrés oxidativo [9].

2.4. Terapias basadas en quelantes de metales

Los metales como el cobre, el zinc y el hierro están presentes en muy alta concentración en el sistema nervioso central en pacientes con Alzheimer, resultando altamente tóxicos al estar implicados en la agregación del péptido y en el estrés oxidativo. Por lo tanto, los quelantes de metales podrían ser una estrategia prometedora contra esta enfermedad [1]. Un ejemplo de esto es el desarrollo de nanopartículas de poliestireno conjugadas al quelante de hierro 2-metil-N-(2'-aminoetil)-3-hidroxil-4-piridinona (MAEHP) que impedían la agregación proteica y la neurotoxicidad [10].

2.5 Otras terapias

Unos nuevos enfoques para el tratamiento del Alzheimer con ayuda de las nanopartículas son el uso de nanopartículas conjugadas a factores de crecimiento o a ADN.

Hay evidencias suficientes acerca del potencial que pueden tener los factores de crecimiento para el tratamiento de esta dolencia, ya que pueden actuar a diferentes niveles de la enfermedad, y sobre los diversos actores que están implicados. Debido a que son propensos a la desnaturalización, el uso de nanopartículas como sistemas de protección, direccionamiento y liberación son de gran interés. Por esta razón, se han desarrollado varios sistemas de liberación de factores de crecimiento con nanopartículas, como por ejemplo nanopartículas basadas en quitosano (que encapsulan BMP-2), nanopartículas sintéticas como poli(láctico-coglicólico) (PLGA) y polibutilcianoacrilato (PBCA), basadas en lípidos, en metales, etc. [11]

Otro enfoque para tratar el Alzheimer lo aporta la terapia génica dado que esta dolencia presenta un fuerte componente genético. Por ello, se pueden diseñar nanopartículas que incorporan plásmidos que codifican para genes terapéuticos (genes de factores de crecimiento nervioso por ejemplo). Por otro lado, la planta *Nigella sativa* (comino negro) presenta numerosos beneficios para la salud, uno de ellos la neuroregeneración, de manera que el aceite de esta planta muestra mejoras en las neuronas degeneradas y es capaz de aumentar las propiedades cognitivas en estudios realizados en ratas. Así, recientemente se ha publicado un estudio en el que se combinan

estas dos estrategias dando lugar a nanopartículas de PLGA que encapsulan el aceite y a las que se adhiere el plásmido nombrado anteriormente mostrando muy buenos resultados *in vitro* [12].

3. NANOPARTÍCULAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL ALZHEIMER

Además de para el tratamiento del Alzheimer, la nanotecnología también puede utilizarse para conseguir un diagnóstico temprano de la misma gracias a las ventajas de las nanopartículas. La visualización temprana de las placas de amiloide es vital para que el tratamiento sea lo más efectivo posible [2].

En este sentido, las nanopartículas magnéticas han sido las más estudiadas para el diagnóstico, ya que son usadas como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen. Un ejemplo es el estudio de Sillerud y colaboradores, que demostraron la eficiencia del marcaje de la diana mediante el uso de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas conjugadas al anticuerpo anti-APP *in vivo*. Estas nanopartículas eran capaces de atravesar la BBB y detectar las placas de amiloide por resonancia magnética de imagen en ratones con la enfermedad de Alzheimer [13].

En otro estudio más reciente, se han utilizado nanopartículas magnéticas de magnetita recubiertas con meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) que incorporaban anticuerpos anti-péptido β -amiloide. Estas nanopartículas resultaron ser biocompatibles y biológicamente activas para su visualización mediante resonancia magnética de imagen, por lo que pueden ser usadas como agentes de contraste para el diagnóstico del Alzheimer en etapas tempranas [2].

4. CONCLUSIONES

En este artículo se han mostrado algunas de las distintas estrategias que se están investigando en la actualidad para el tratamiento y diagnóstico del Alzheimer con ayuda de la nanotecnología. Las ventajas que ofrecen las nanopartículas (como su pequeño tamaño, superficie química ajustable y buena estabilidad) son su principal aval para que la ciencia las esté considerando como estrategias con mucho potencial para el tratamiento de esta enfermedad, debido al problema que supone la impermeabilidad de la barrera hematoencefálica. Además, las nanopartículas pueden ser utilizadas simultáneamente para el tratamiento y diagnóstico del Alzheimer, es decir, a la misma nanopartícula que se utiliza para el diagnóstico se le puede incorporar el agente terapéutico determinado. Esta nueva aproximación se conoce como teranóstico. Son muchas las estrategias que se están estudiando pero no han llegado todavía a la clínica dado que faltan por dilucidar algunos mecanismos de la enfermedad.

En definitiva, la nanotecnología puede ser una gran aliada para el tratamiento de una enfermedad tan importante y grave como lo es el Alzheimer.

REFERENCIAS

- [1] Gu X, Chen H & Gao X. Nanotherapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Therapeutic Delivery*. 6(2):177-95 (2015).
- [2] Yin Z, Yu T & Xu Y. Preparation of Amyloid Immuno-Nanoparticles as Potential MRI Contrast Agents for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Journal of Nanoscience & Nanotechnology*. 15(9):6429-6434. (2015)
- [3] Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*. 29 (4), 341-345 (2011).
- [4] Li M, Xu C, Wu L *et al.* Self-assembled peptide-polyoxometalate hybrid nanospheres: two in one enhances targeted inhibition of amyloid β -peptide aggregation associated with Alzheimer's disease. *Small* 9 (20), 3455-3461 (2013).
- [5] Cheng KK, Yeung CF, Ho SW, *et al.* Highly stabilized curcumin nanoparticles tested in an *in vitro* blood-brain barrier model and in Alzheimer's disease Tg2576 mice. *AAPS J*. 15 (2), 324-336 (2013).
- [6] Song Q, Huang M, Yao L *et al.* Lipoprotein-based nanoparticles rescue the memory loss of mice with Alzheimer's disease by accelerating the clearance of amyloid- β . *ACS Nano*. 8(3), 2345-2359 (2014).
- [7] Zhang C, Wan X, Zheng X *et al.* Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer's disease mice. *Biomaterials* 35 (1), 456-465 (2014).
- [8] Ismail MF, Elmehad AN & Salem NA. Potential therapeutic effect of nanobased formulation of rivastigmine on rat model of Alzheimer's disease. *Int. J. Nanomedicine*. 8, 393-406 (2013).
- [9] Kwon HJ, Cha M-Y, Kim D, *et al.* Mitochondria-Targeting Ceria Nanoparticles as Antioxidants for Alzheimer's Disease. *ACS Nano*. 10, 2860-2870 (2016).
- [10] Liu G, Men P, Kudo W *et al.* Nanoparticle-chelator conjugates as inhibitors of amyloid- β aggregation and neurotoxicity: a novel therapeutic approach for Alzheimer disease. *Neurosci. Lett*. 455(3), 187-190 (2009).
- [11] Lauzon M-A, Daviau A, Marcos B & Faucheux, N. Nanoparticle-mediated growth factor delivery systems: A new way to treat Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*. 206, 187-205 (2015).
- [12] Doolaanea AA, Mansor N 'Izzati, Mohd Nor NH & Mohamed F. Co-encapsulation of Nigella sativa oil and plasmid DNA for enhanced gene therapy of Alzheimer's disease. *J Microencapsul*. 33 (2):114-126 (2016).
- [13] Sillerud L.O, Solberg N.O, Chamberlain R. *et al.* SPION-enhanced magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease plaques in A β PP/PS-1 transgenic mouse brain. *Journal of Alzheimer's Disease*. 34, 349-365 (2013).



Manuel Velasco Gomariz Graduado en Biotecnología por la Universidad de Murcia. Actualmente cursa el Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Nanopartículas de curcumina: Estrategias y aplicaciones

Juan Gómez Pinto

Resumen—La curcumina ha sido utilizada desde la antigüedad como hierba medicinal en la cultura oriental tradicional, y sus beneficios se han descrito y probado experimentalmente. Entre los principales inconvenientes de su uso destacan su baja solubilidad en disolventes polares, baja biodisponibilidad, baja absorción y rápida eliminación por el organismo. Estos inconvenientes podrían solventarse en gran medida gracias a la nanoformulación. En este artículo mostramos las principales estrategias de obtención de nanocurcumina y sus posibles usos terapéuticos a día de hoy. Entre las distintas aplicaciones destacamos el potencial carácter antitumoral, antiinflamatorio, neuroprotector y antimicrobiano.

Palabras Claves— Curcumina, antitumoral, neuroprotección, nanoformulación.



1. INTRODUCCIÓN

La curcumina es un producto natural obtenido de la planta cúrcuma (*Curcuma longa*). Este compuesto ha sido tradicionalmente usado en la cultura asiática como una especia cuya característica principal es su coloración amarilla. Simultáneamente, también destacaron su carácter bioactivo en diferentes condiciones patológicas como son el asma, alergias, anorexia, coriza, tos, enfermedades hepáticas, sinusitis, diabetes, enfermedades reumatoideas, arteriosclerosis, enfermedades infecciosas, cáncer, etc. [1],[2]. Posteriormente, a nivel biológico, se ha demostrado experimentalmente que este compuesto posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, neuroprotectora, microbicida y antidiabética [3].

Este polifenol, denominado químicamente como 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-hepta-dien-3,5 diona, es un compuesto lipófilo que es capaz de atravesar la membrana plasmática de la célula con gran facilidad, sin embargo, debido a su naturaleza no es soluble en disolventes polares y presenta una tasa baja de biodisponibilidad para la célula, debido a su rápida metabolización y eliminación y a su baja tasa de absorción [4].

Ante estos problemas, el desarrollo de la nanotecnología ha abierto un amplio abanico de estrategias que buscan mejorar tanto el tiempo de vida media del compuesto en el organismo, como aumentar su tasa de absorción, su estabilidad química, farmacodinámica y solubilidad en medio acuoso.

En este artículo trataremos las estrategias de nanoformulación que se han seguido en estudios recientes y su aplicación en el campo de la biomedicina.

2. ESTRATEGIAS Y APLICACIONES

Se han descrito diferentes estrategias para la nanoformulación de la curcumina, basadas, principalmente, en el uso de distintos tipos de nanosistemas para encapsularla o conjugarla.

Esto supone el diseño de nanopartículas novedosas y completamente personalizadas que las vuelven productos únicos. A lo largo del artículo serán nombradas junto con su aplicación.

A nivel experimental se ha encontrado que se producen mejoras significativas en las propiedades de biodisponibilidad, solubilidad, y estabilidad de la molécula de curcumina cuando se encapsula en cualquiera de las nanoestructuras que trataremos a continuación, propiedades que además se pueden modificar mediante variaciones en la composición química de las mismas [5].

2.1. Liposomas

La estructura liposomal está constituida por una bicapa fosfolipídica que enfrenta sus colas apolares entre sí, y sus cabezas polares quedan proyectadas hacia el interior y el exterior de la estructura. Estos complejos pueden alcanzar diámetros variados que pueden oscilar entre los 25 nm y los 2,5 μ m y han sido tradicionalmente usados como vectores en la encapsulación y administración de fármacos, por ser capaces de atravesar la membrana plasmática fácilmente [5].

Diferentes autores han desarrollado sistemas liposomales para la administración de la curcumina. *Shi et al.* [6] observaron efectos preventivos de la curcumina encapsulada en liposomas sobre la fibrosis de pulmón, y una sensibilización de las células tumorales LL/2 a la radiación en modelos de ratón. *Dhule et al.* [7] han diseñado nanopartículas liposomales de curcumina recubierta con γ -ciclodextrina y las han utilizado en modelos de ratón de osteosarcoma y cáncer de mama, reflejando los datos obtenidos en estos modelos un potencial rol antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*. También se observan en otros ejemplos recogidos de la bibliografía efectos antimelanoma [8], antitumoral y antiangiogénico en células humanas de cáncer de páncreas (*in vitro*) [9].

2.2. Micelas

La estructura micelar está constituida por una monocapa que se orienta en función de la polaridad del disol-

vente, estas estructuras son de naturaleza anfipática y, por tanto, encapsulan en su interior curcumina, volviéndola más estable en agua. Su gran interés radica en su gran capacidad de carga, baja toxicidad, alta estabilidad en agua, y en la capacidad de generar partículas inferiores a 200 nm [10].

El grupo del doctor Maitra ha diseñado una nanoformulación micelar de la curcumina (*NanoCure*), consistente en la polimerización de N-isopropilacrilamida con poli(etilenglicol)-monoacrilato, N-vinil-2-pirrolidona y N,N-metilenbisacrilamida, persulfato amónico, sulfafo de amonio ferroso y tetrametiletildiamina (TEMED), formando micelas de unos 50 nm con una liberación del 40% de la curcumina a pH fisiológico, además de gran biodisponibilidad y mayor actividad antitumoral que la curcumina libre [4].

Experimentalmente se ha ensayado el comportamiento antioxidante de las nanomicelas de curcumina. *Yu et al.* [11] han diseñado nanomicelas usando como recubrimiento la ϵ -polilisisina, obteniendo un mayor efecto antioxidante y una mayor solubilidad que la curcumina libre. Otras nanoformulaciones micelares en las que se encontraron los mismos efectos fueron las basadas en dodecil-sulfato sódico y bromuro de cetiltrimetilamonio [12].

Ravendraan et al. [13] sintetizaron micelas mixtas de plurónico y policaprolactona. Sus experimentos muestran una actividad antitumoral significativa en cáncer de colon frente a la administración de curcumina libre. *Wang et al.* [14] muestran efectos beneficiosos en células 4T1 de cáncer de mama, ya que eran más efectivas en la inhibición de la tumorigénesis y de la metástasis espontánea a pulmón. Adicionalmente, también se observó un mayor efecto apoptótico en las células tumorales, menor proliferación celular tumoral y menor vascularización.

2.3. Ciclodextrinas

Son oligosacáridos obtenidos del almidón que forman uniones O-glucosídicas α -1,4 para dar lugar a ciclos característicos de 6, 7 y 8 uniones, comúnmente clasificados como α , β , y γ -ciclodextrinas, respectivamente. Estas moléculas son solubles en disolventes polares y permiten incorporar en su cavidad interna fármacos apolares.

Se han realizado ensayos comparativos para valorar la permeabilidad de la administración de curcumina libre y sin nanopartículas. Los resultados obtenidos muestran que la administración de curcumina incorporada en ciclodextrinas aumenta 1,8 veces la permeabilidad en piel animal [15]. Adicionalmente, también se observan resultados que muestran una mayor estabilidad de la curcumina incorporada a la ciclodextrina frente a la hidrólisis que sufre libre [5].

Yadav et al. [16] han ensayado el potencial antiinflamatorio del complejo curcumina/hidroxiopropil- β -ciclodextrina en modelos de colitis, en rata. Los resultados muestran propiedades anti-angiogénicas, además de mostrar una atenuación de la colitis in vivo.

En otro ensayo se ha usado un análogo de la curcumina, la curcumina difluorada (CDF), para sintetizar un complejo CDF- β -ciclodextrina-curcumina con propiedades potenciadoras del efecto antiproliferativo en cáncer

de páncreas, tejido en el que se encontraba en concentración 10 veces superior a la del suero (bioacumulación) [17].

Por último, nanopartículas formadas por ciclodextrina conjugada con partículas de oro, y que incorporan curcumina, inhiben significativamente la acción osteoclástica en médula ósea, mediante la inhibición del receptor activador de NF- κ B, produciendo efectos beneficiosos sobre la osteoporosis [4].

2.4. Polímeros

Los polímeros están constituidos por monómeros capaces de ensamblarse entre sí y formar largas estructuras lineales o ramificadas que pueden sorportar en su interior la incorporación de un fármaco. Entre sus distintas variantes están los dendrímeros, consistentes en moléculas que polimerizan formando estructuras ramificadas y radiales que forman esferas. Estos tienen la ventaja de que permiten una amplia funcionalización en su superficie, mientras en el interior ramificado se inserta la curcumina [5]. *Debnath et al.* [18] obtienen resultados *in vitro* que muestran un mayor efecto citotóxico de la curcumina administrada de esta forma contra las células de cáncer de pecho humano SKBr3 y BT549, y que aumenta la apoptosis de las mismas. *Ceo et al.* [19] diseñaron un dendrímero de poliamidoamina-C para encapsular curcumina y observaron una disminución de la actividad telomerasa, un aumento de la apoptosis y de la absorción de curcumina en células de cáncer de mama humano.

Los nanogeles consisten en una estructura polimérica más amorfa, formada por el entrecruzamiento entre sus subunidades que generan una matriz más laxa y porosa, que permite su hidratación. *Mangalathillam et al.* [20] han conseguido introducir la curcumina en nanogeles de quitina, los resultados obtenidos en sus ensayos muestran una especificidad alta por las células de melanoma pero no por células normales, destacando su potencial aplicación anti-tumoral. Además presentaban mayor absorción y no se recogían signos de inflamación. *Wei et al.* [21] sintetizaron un nanogel consistente en un conjugado de ácido hialurónico y ésteres de colesterol para la localización y supresión de células tumorales con la expresión del marcador de membrana CD44. Los resultados muestran un efecto citotóxico de 2 a 7 veces mayor en células tumorales CD44 de cáncer de mama y pancreático.

Para la regeneración de heridas se ha descrito una aproximación que utiliza un hidrogel conjugado formado por nanocurcumina/N, O-carboximetil quitosano/alginato oxidado [22]. Los experimentos llevados a cabo con él muestran la reepitelialización de la epidermis y la deposición de colágeno en heridas dorsales de rata. El contenido en DNA, proteínas e hidroxiprolina en la herida indicaban que aceleraba el proceso de curación [22].

El quitosano es un polímero de origen glucosacárido muy común en la síntesis de nanopartículas. Una estrategia novedosa encapsula la curcumina con poli(butil) cianoacrilato y las recubre con quitosano, este diseño se realizó como una posible terapia frente al cáncer de hígado [23].

2.5. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs)

Son nanopartículas formadas por lípidos tolerados fisiológicamente, que presentan forma sólida a temperatura ambiente, formando suspensiones coloidales. Este nuevo sistema es capaz de contener mayor cantidad de fármaco, es fácilmente escalable, esterilizable, permite un mejor control de la cinética de liberación del compuesto, mayor biodisponibilidad, protección química y larga estabilidad [10]. Entre los lípidos mayormente utilizados se encuentran los triglicéridos. *Kakkar et al. (2011)* [24] sintetizaron por microemulsificación SLNs de curcumina, el tamaño medio de partícula fue de 134,6 nm. Los resultados experimentales obtenidos reflejaron un aumento de la biodisponibilidad de la molécula administrada en forma de SLNs frente a la administración de curcumina libre.

En ratones Balb/c se ensayó la administración de SLN-curcumina como posible terapia para la parada cardíaca y sus complicaciones. Los resultados del ensayo demostraron que la biodisponibilidad del fármaco aumentaba desde 32 hasta 1555 veces, que la farmacodinámica es de 3 a 4 veces superior y que la direccionalización al tejido nervioso central es 8 veces mayor que de forma libre [4]. *Kakka et al. (2013)* [25] describieron un papel beneficioso del uso de SLN-curcumina en la resistencia oxidativa, en respuesta al estrés producido por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, en la actividad acetilcolinesterasa y de los complejos enzimáticos mitocondriales. Los parámetros fisiológicos medidos en un modelo de rata para los daños producidos por reperfusión isquémica en tejido cerebral, parecen mostrar un papel neuroprotector frente al infarto isquémico [25]. *Arora et al. [26]* estudiaron el efecto antiinflamatorio de la SLN-curcumina en ratas modelo de artritis reumatoide. Los datos obtenidos en los experimentos sugerían un papel protector de la SLN-curcumina frente a la artritis reumatoide. Finalmente, también se describen nanoformulaciones que han generado beneficios en modelos animales de cáncer y asma, destacando la potencial aplicación terapéutica que puede tener la curcumina administrada como nanopartículas lipídicas sólidas [5].

2.6. Nanopartículas de oro y plata.

Los principales beneficios que aportan estas nanopartículas son sus propiedades, características de su plasmón de superficie, además de ser altamente estables y conjugarse muy bien con biomoléculas.

Se han diseñado nanopartículas de oro con elevada capacidad de cargar curcumina y direccionarla a células tumorales. Las nanopartículas están recubiertas de citrato de sodio y tienen un diámetro de 13 nm. Los resultados experimentales obtenidos muestran un efecto antitumoral, observándose la supervivencia y regeneración de las células normales que han absorbido las nanopartículas, y la entrada en apoptosis de las tumorales [27]. Se han llevado a cabo estudios donde se han ensayado con nanopartículas de oro funcionalizadas con curcumina en modelos de Alzheimer. Los resultados obtenidos han mostrado efectos neuroprotectores. Adicionalmente, la nanopartícula funcionalizada eficientemente interactuaba con el péptido β -amiloide, inhibía la formación de fibras,

y disolvía las fibras amiloideas ya generadas actuando como una especie de chaperona artificial [4].

Las nanopartículas de plata poseen una característica especial que las diferencia de las de oro, esta es su carácter antimicrobiano, siendo letal para la mayoría de virus y bacterias a baja concentración. Se ha llevado a cabo el diseño de biofilms de nanopartículas de plata que transportan curcumina. Estas nanopartículas tienen un tamaño de partícula de 15 nm. La incorporación de la curcumina a la película de nanocomposite se consiguió mediante mecanismos de difusión [5]. En otro estudio, se ha diseñado un composite usando hidrogel, curcumina y nanopartículas de plata. Este composite se ha sintetizado mediante la polimerización de acrilamida en presencia de la sal sódica de ácido polivinil sulfónico y un entrecruzador trifuncional (2, 4, 6-trialiloxi 1, 2, 3-triacina), usando un sistema iniciador redox. Las nanopartículas se produjeron en la matriz del hidrogel mediante métodos *in situ* incorporando los iones de plata seguido de borohidruro de sodio. La curcumina se introdujo por difusión [28]. Ambos diseños han proporcionado excelentes propiedades antimicrobianas.

3. CONCLUSIONES

La aparición de la nanoformulación ha supuesto una revolución en el campo de la biomedicina. En especial la administración de nanocurcumina ha generado una inmensa cantidad de resultados que apuntan a que podría ser una excelente terapia de enfermedades como el cáncer de colon, de páncreas, de mama, osteosarcoma, asma, artritis reumatoide, osteoporosis, Alzheimer, etc.

Los datos que aparecen en la bibliografía son alentadores respecto al gran potencial terapéutico que posee la administración de curcumina nanoformulada. No obstante, el gran inconveniente que sigue mostrando la síntesis de nanopartículas es su polidispersión, que puede variar según el método de síntesis empleado y las condiciones, siendo difícil obtener homogeneidad en su tamaño y forma y, por tanto, en sus propiedades (en el caso de las nanopartículas metálicas su plasmón superficial). Esto supone una disminución del rendimiento final de la síntesis, y un inconveniente fundamental en su extrapolación del laboratorio a la clínica y a la producción industrial farmacéutica, donde se necesitan altos niveles de control y normalización del producto. Por estos motivos, y pese a los resultados positivos obtenidos a nivel experimental, aún están lejos de la clínica. Para su distribución farmacológica es imprescindible, como hemos comentado con anterioridad, tener un control absoluto de las propiedades de la nanopartícula, (entre ellos su tamaño y forma) durante su síntesis. Además tienen que superar todas las pruebas preclínicas pertinentes antes de su comercialización como fármaco.

REFERENCIAS

- [1] HP. Ammon y MA. Wahl, "Pharmacology of Curcuma longa," *PlantaMedica*, 1991, vol. 57, no.1, pp. 1-7.
- [2] I. Rahman, SK. Biswas, PA. Kirkham. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72:

- 1439-52.
- [3] BB. Aggarwal, C. Sundaram, N. Malani, H. Ichikawa. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595: 1-75.
- [4] MM. Yallapu, PKB. Nagesh, M. Jaggi, y SC. Chauhan. Therapeutic Applications of Curcumin Nanoformulations. *AAPS J.* 2015, 17, 1341-56.
- [5] N. Ghalandarlaki, AM. Alizadeh, S. Ashkani-Esfahani. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. *Biomed Res. Int.* 2014, 1-23.
- [6] HS. Shi, X. Gao, D. Li et al., "A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation," *International Journal of Nanomedicine*, 2012, vol. 7, pp. 2601-2611.
- [7] SS. Dhule, P. Penfornis, T. Frazier et al., "Curcumin-loaded γ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012, vol. 8, no. 4, pp.440-451.
- [8] Y. Chen, Q. Wu, Z. Zhang, L. Yuan, X. Liu, y L. Zhou, "Preparation of curcumin-loaded liposomes and evaluation of their skin permeation and pharmacodynamics," *Molecules*, 2012, vol.17, no. 5, pp. 5972-5987.
- [9] WS. Orr, JW. Denbo, KR. Saab et al., "Liposome-encapsulated curcumin suppresses neuroblastoma growth through nuclear factor-kappa B inhibition," *Surgery*, 2012, vol. 151, no. 5, pp.736-744.
- [10] S. Wang, M. Tan, Z. Zhong, M. Chen, y Y. Wang. Nanotechnologies for curcumin: An ancient puzzler meets modern solutions. *J. Nanomater.* 2011.
- [11] H. Yu, J. Li, K. Shi, y Q. Huang, "Structure of modified ϵ -polylysine micelles and their application in improving cellular antioxidant activity of curcuminoids," *Food and Function*, 2011, vol.2, no. 7, pp. 373-380.
- [12] F. Dai, W-F. Chen, B. Zhou, L. Yang, y Z-L. Liu, "Antioxidative effects of curcumin and its analogues against the free radical-induced peroxidation of linoleic acid in micelles," *Phytotherapy Research*, 2009, vol. 23, no. 9, pp. 1220-1228.
- [13] R. Raveendran, G. Bhuvaneshwar, y CP. Sharma, "In vitro cytotoxicity and cellular uptake of curcumin-loaded Pluronic/Polycaprolactone micelles in colorectal adenocarcinoma cells," *Journal of Biomaterials Applications*, 2013, vol.27, no.7, pp. 811- 827.
- [14] F. Wang, W. Huang, L. Jiang, y B. Tang, "Quantitative determination of proteins based on strong fluorescence enhancement in curcumin-chitosan-proteins system," *Journal of Fluorescence*, 2012, vol. 22, no. 2, pp. 615-622.
- [15] S. Prasad, AK. Tyagi, BB. Aggarwal. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice. *Cancer Res. Treat.* 2014, 46, 2-18.
- [16] V. R. Yadav, S. Suresh, K. Devi, y S. Yadav, "Effect of cyclodextrin complexation of curcumin on its solubility and antiangiogenic and anti-inflammatory activity in rat colitis model," *AAPS PharmSciTech*, 2009, vol. 10, no. 3, pp. 752-762.
- [17] P. R. Dandawate, A. Vyas, A. Ahmad et al., "Inclusion complex of novel curcumin analogue CDF and β -cyclodextrin (1:2) and its enhanced in vivo anticancer activity against pancreatic cancer," *Pharmaceutical Research*, 2012, vol. 29, no.7, pp. 1775-1786.
- [18] S. Debnath, D. Saloum, S. Dolai et al., "Dendrimer-curcumin conjugate: a water soluble and effective cytotoxic agent against breast cancer cell lines," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 13, no. 10, pp.1531-1539.
- [19] J. Cao, H. Zhang, Y. Wang, J. Yang, y F. Jiang, "Investigation on the interaction behavior between curcumin and PAMAM dendrimer by spectral and docking studies," *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2013, vol. 108, pp. 251-255.
- [20] S. Mangalathillam, NS. Rejinold, A. Nair, V.-K. Lakshmanan, SV.Nair, y R. Jayakumar, "Curcumin loaded chitin nanogels for skin cancer treatment via the transdermal route," *Nanoscale*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 239-250.
- [21] X. Wei, T. H. Senanayake, G. Warren, y S. V. Vinogradov, "Hyaluronic acid-based nanogel-drug conjugates with enhanced anticancer activity designed for the targeting of CD44-positive and drug-resistant tumors," *Bioconjugate Chemistry*, 2013, vol. 24, no. 4, pp. 658-668.
- [22] X. Li, S. Chen, B. Zhanget al., "Insituinjectable nano-composite hydrogel composed of curcumin, N,O-carboxymethyl chitosan and oxidized alginate for wound healing application," *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, vol. 437, no. 1-2, pp.110-119.
- [23] S. Kommareddy, SB. Tiwari, y MM. Amiji, "Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery," *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2005, vol. 4, no. 6, pp. 615-625.
- [24] V. Kakkar, S. Singh, D. Singla, y IP.Kaur, "Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin," *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, vol.55, no.3, pp.495-503.
- [25] V. Kakkar, SK. Muppu, K. Chopra, IP. Kaur. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: an efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats. *Eur J Pharm Biopharm: Of f J Arbeitsgemeinschaft fur Pharm Verfahrenstechnik eV.* 2013; 85 (3 Pt A):339-45.
- [26] R. Arora, A. Kuhad, IP. Kaur, K. Chopra. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats. *Eur J Pain.* 2014.
- [27] A. Moten, "The use of gold-citrate nanoparticles and curcumin nanomedicine to target cancer at a single cell level," in *Proceedings of the NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show*, 2008.



Juan Gómez Pinto recibió el título de Bioquímica por la Universidad de Córdoba en 2015. Desde 2011 hasta 2014 fue Alumno Interno en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. Actualmente se encuentra cursando el Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide. Su interés investigador incluye el análisis de expresión genética, el análisis de respuestas a estrés oxidativo, y los mecanismos de diferenciación y regeneración pancreática.

Nanoemulsiones y sus aplicaciones en cosmetica

Loreto González González

Resumen—La demanda de productos cosméticos por parte de los consumidores hace que el desarrollo de nuevas formulaciones más sofisticadas avance muy rápido, teniendo siempre en cuenta las restricciones de estas formulaciones, el equilibrio óptimo entre la concentración del principio activo y la base de la formulación y la estructura de la piel. La emulsión es la fórmula más usada en cosmética, es una mezcla de fases inmiscibles, y el interés en una emulsión a tamaño nanométrico ha aumentado en los últimos años debido a su gran estabilidad, comparada a la de las microemulsiones y su idoneidad al la hora de encapsular principios activos. Las nanoemulsiones son generadas principalmente por dos métodos, de alta y de baja energía y, dependiendo de las características de la emulsión, usaremos uno u otro método.

Palabras Claves— Nanoemulsión, cosmetica, tensioactivos, alta energía, baja energía.

1. INTRODUCCIÓN

La piel es una barrera física que proporciona protección al cuerpo humano frente a daños externos, ya sean químicos, físicos o incluso biológicos. Para entender la piel como barrera es necesario comprender su estructura. La piel está formada por múltiples capas, de fuera a dentro nos encontramos con la epidermis, la dermis y por último el tejido subcutáneo. La primera capa de la epidermis es la conocida como estrato corneo. El estrato corneo está compuesto por células queratinizadas muertas y una matriz lipídica, compuesta por ceramidas, ácidos grasos, colesterol y ésteres de colesterol que proporcionan unas excelentes propiedades a la piel.

Cuando aplicamos una formulación tópica el principio activo puede penetrar en la piel por tres métodos diferentes: (1) vía intercelular, (2) por medio de los folículos pilosos y (3) por la ruta transcelular, siendo este el menos comprendido. [Figura 1]

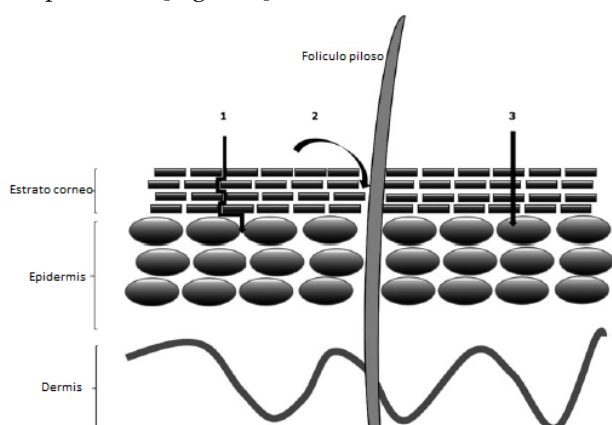


Figura 1. Mecanismos de penetración a través de la piel [1]

En el campo de la cosmética se requiere cierta penetración del principio activo, pero no se necesita absorción de este. La penetración depende de ciertos factores como son el tamaño de la molécula, el grado de ionización, el coeficiente de reparto, la densidad... los sistemas de emulsión en el rango de la nanoescala son los que vamos a comentar en esta revisión [1].

2. ¿QUÉ ES UNA NANOEMULSIÓN?

Una emulsión es un sistema que contiene dos fases inmiscibles y, por tanto, tres componentes, una fase acuosa, una fase oleosa y un tensioactivo; además de un principio activo. La naturaleza del agente tensioactivo es la que determina la fase externa de la emulsión, se clasifican las emulsiones en dos: O/W cuando la fase externa es el agua y la interna la oleosa, y W/O cuando la fase externa es oleosa y la interna acuosa. Desde 1980 la atención se ha centrado en las emulsiones con un tamaño de gota nanométrica y sus aplicaciones en cosmética y otras formulaciones tópicas. Las nanoemulsiones tienen un tamaño de gota media comprendida de 50 a 1000 nm, y son estables frente a la sedimentación debido a su tamaño de gota tan pequeño y a los tensioactivos etoxilados iónicos y no iónicos utilizados. Muchos autores consideran que el límite está en 500 nm, pero al no haber un cambio drástico en las propiedades fisicoquímicas desde 500 a 1000, se pueden incluir como nanoemulsiones.

Las nanoemulsiones se clasifican dependiendo al tamaño de gota en: transparente o translúcida (50 a 200 nm) y en lechosa (hasta 500 nm) [1]. Las nanoemulsiones presentan una serie de ventajas frente a las emulsiones macroscópicas, en primer lugar el tamaño de gota pequeño que hace que la distribución por la piel sea más uniforme, la liberación del principio activo es más controlada, la estabilidad es mejor, tiene menos oclusividad y el carácter estético y la sensación en la piel es mejor, entre otras. La

nanoemulsión es una emulsión cinéticamente estable, que al ser un sistema termodinámicamente inestable no se puede formar por sí sola, necesitando un aporte energético. Para preparar una nanoemulsión podemos optar por dos métodos: el método de alta energía y el método de baja energía.

En el campo de la cosmética la nanoemulsión O/W por el método de alta energía es lo más común, pero está despertando actualmente mucho interés el método de baja energía.

3. PROCESO DE OBTENCIÓN DE NANOEMULSION. MECANISMO DE ALTA ENERGÍA.

El proceso de nanoemulsión por medio de mecanismo de alta energía requiere la aplicación de alta energía para la formación de las gotitas. El proceso utiliza la fuerza mecánica, lo que resulta en el desarrollo de grandes áreas interfaciales para la formación de la nanoemulsión. La tensión que se aplica al fluido debe ser mayor que la tensión interfacial de los dos líquidos inmiscibles, las gotas más grandes se rompen en gotas más pequeñas y como consecuencia se crea una gran área de superficie total [2]. El proceso de alta energía es seguido por dos pasos: el primero, la deformación y alteración de las gotitas macromoleculares en gotas más pequeñas; y el segundo paso es la absorción del tensioactivo en la interfase. Los métodos de alta energía se clasifican en cuatro:

- Agitación de alto cizallamiento utilizando un sistema de rotor o estator
- Ultrasonidos
- Homogenización de alta presión (HPH)
 - Técnica HPH en caliente.
 - Técnica HPH en frío
- Microfluidización

3.1. Aplicaciones en cosmética

Mediante el método de ultrasonidos se ha obtenido una nanoemulsión O/W como protección solar. Su composición es de 5% de aceite de aguacate, 1% de metoxicinamato de octilo y un 0,25 de dióxido de titanio, con un factor de protección solar de 3. El tamaño de gota es de entre 6 y 10 nm. Se obtuvo una liberación lenta y sostenida del metoxicinamato de octilo durante 4 horas. Lo más importante que obtenemos es una ventaja frente a la absorción y la retención de humedad percutánea. [3] Se usa como porteccto solar.

Otro ejemplo de nanoemulsión es la obtenida mediante homogeneizador de alta presión que contiene aceite, lecitina de soja en la fase oleosa, monooleato de sorbitan de polioxietileno como tensioactivo y glicerol en la fase acuosa. Los tensioactivos son un punto muy importante pues influyen en la estabilización de la formulación y se identificó la siguiente combinación: 56,5% de aceite de semilla de colza, 35,5% de Miglyol y 8% de aceite de salmón. Donde el tamaño de gotita esa de 143 nm y un índice de polispersidad de 0,16. Esta combinación ha demostrado una alta estabilidad. Esta nanoemulsion, no tiene

una aplicación concreta, es decir, se usa como matriz. A ella le añadimos el principio activo y lo vehiculiza. [1]

4. PROCESO DE OBTENCIÓN DE NANOEMULSION. MECANISMO DE BAJA ENERGÍA

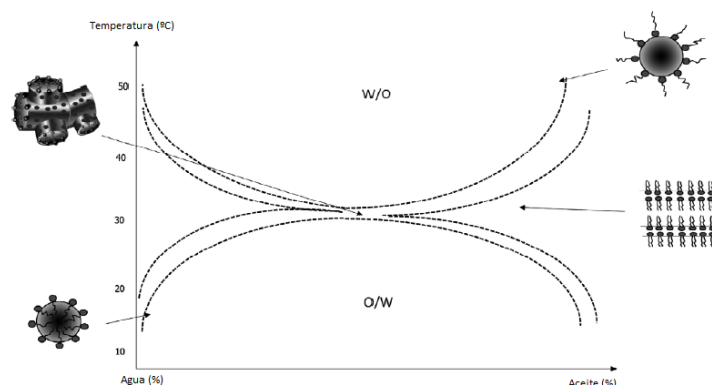
El mecanismo de baja energía se basa en aplicar una baja cantidad de energía o simplemente realizando un mezclado suave para generar la nanoemulsión. Ese proceso depende de las propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos y de los excipientes que forman la formulación, ya que la energía proviene de los cambios de fases que se producen en la formación de las mismas. [4] El interés en la utilización de estos metidos ha crecido en los últimos años debido a que es un proceso suave y que se ahorra mucha energía en la producción a gran escala.

El método de baja energía se clasifica en tres:

- Inversión transicional
- Inversión catastrófica
- Emulsión por inversión

Existe una fuerte correlación entre el tipo de tensioactivo y el comportamiento de la fase de tensioactivo-aceite-agua. La influencia de la temperatura, así como la composición del agente tensioactivo-aceite-agua, genera una estructura de micelas que se muestran en el diagrama de fases de la Figura 2.

Figura 2. Diagrama de estructuras de micelas [1]



4.1. Aplicaciones en cosmética

El método de inversión de fase se aplicó para la formación de una nanoemulsión O / W en el sistema catiónico, compuesto de agua y oleilamonio de cloruro de oleilamina-C12E10 / hexadecano. Los resultados de los experimentos, tanto anionico como catiónico, se compararon, el sistema y se obtuvieron las emulsiones de tamaño de gotitas más pequeño en el catiónico que el anionico. Esto implica que el proceso de dilución influye en el tamaño nanoemulsión [5]. Al igual que nanoemulsiones anteriores, se está estudiando para la vehiculización de principios activos.

Otra aplicación la vemos en las nanoemulsiones enriquecidas en vitamina E, obtenidas por emulsión espontánea. Sus características fueron examinadas, y en el tamaño de las gotas y la composición de aceite ha tenido un gran impacto. Otra características, el tipo de agente tensioactivo, su concentración, la temperatura de mezcla y la velocidad de agitación cuando se añadió la fase orgánica

a la fase acuosa también tuvieron un impacto en el diámetro medio de partícula de las gotitas. [6] Se espera que esta nanoemulsión sea aplicada como suplemente alimentario, para comidas y bebidas.

5. DIFERENCIAS Y SIMILITUDES DE AMBOS METODOS

Los procesos tanto de alta energía como de baja energía tienen diferentes variables que afectan a la formulación de la nanoemulsión. El método de alta energía se rige por parámetros de formulación directamente controlables como son la cantidad de energía que se le aplica, la cantidad de tensioactivo y la naturaleza de los componentes que van a formar la formulación. Por otro lado el método de baja energía requiere un conocimiento profundo de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas y del comportamiento de los sistemas.

La diversidad de aparatos y metodologías disponibles, los recientes avances en la tecnología y la continua demanda por cosméticos nuevos contribuyen al progreso de investigación en nanoemulsiones.

Es muy importante tener en cuenta el paso entre la escala de laboratorio a la producción a gran escala, la viabilidad y el coste de producción. Así por ejemplo un homogeneizador de alta presión y o microfluidización se pueden aplicar tanto en laboratorio como en industria mientras que el método de ultrasonidos principalmente se aplica a nivel de laboratorio. Los procesos de alta energía como su nombre indica requieren una gran cantidad de energía para romper las gotas a escala nanométrica, por lo que, el consumo de energía y el tiempo requerido depende de la cantidad de nanoemulsión producida y tendrá un coste mayor.

Por otro lado cuando se producen métodos de baja energía, son procesos en los que tenemos un gran ahorro energético, salvo en la inversión de fases que se realiza con grandes cambios de temperatura. De esta manera al ser un proceso dependiente de temperatura tiene la flexibilidad de ser repetido varias veces aumentando y disminuyendo la temperatura para garantizar la calidad de las nanogotas en el final de la producción. Así proporciona una gran ventaja a nivel industrial.

Las gotas de tamaño nanométrico y el índice de polidispersión son influenciados por el método elegido para su preparación. Sin embargo la maduración de Ostwald, que es el principal proceso de desestabilización de las nanoemulsiones es el mismo independientemente del método utilizado para su preparación. [1]

6. CONCLUSIONES

Las nanoemulsiones son una nueva clase de dispersiones que ofrecen una amplia gama de posibilidades para aplicaciones innovadoras, no solo en el campo de la cosmética sino también en el campo dermatológico.

Las características actuales en las que se centra, para una gran productividad a la hora de la fabricación de nanoemulsiones son claras, bajo índice de polidispersidad y tamaño de nanogotas nanométrico, todo ello enfocado a una mayor eficacia y seguridad del producto final.

La nanotecnología ofrece una alternativa a escala comercial realista para el campo de la cosmética y la dermatología, aunque se necesitan más estudios para tener una mayor comprensión de cómo interactúan las fases durante el procesamiento y el almacenamiento.

La participación en estos retos es importante y ha generando múltiples beneficios, la nanoemulsión tiene un gran potencial para dar forma a muchos productos futuros.

REFERENCIAS

- [1] M. N. Yukuyama, D. D. M. Ghisleni, T. J. A. Pinto, and N. A. Bou-Chacra, "Nanoemulsion: Process selection and application in cosmetics - A review," *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 38, no. 1, pp. 13–24, 2016.
- [2] A. Maali and M. T. H. Mosavian, "Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010)," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 34, no. 1, pp. 92–105, 2013.
- [3] F. F. F. Silva, E. Ricci-Júnior, and C. R. E. Mansur, "Nanoemulsions containing octyl methoxycinnamate and solid particles of TiO₂ : preparation, characterization and in vitro evaluation of the solar protection factor.," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 39, no. 9, pp. 1378–1388, 2013.
- [4] M. Jaworska, E. Sikora, M. Zielina, and J. Ogonowski, "Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification method, suitable for cosmeceutical applications," *Acta Biochim. Pol.*, vol. 60, no. 4, pp. 779–782, 2013.
- [5] I. Solé, A. Maestro, C. González, C. Solans, and J. M. Gutiérrez, "Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system," *Langmuir*, vol. 22, no. 20, pp. 8326–8332, 2006.
- [6] A. H. Saberi, Y. Fang, and D. J. McClements, "Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 391, no. 1, pp. 95–102, 2013.



Loreto González González recibió el título de Licenciada en farmacia por la Universidad de Sevilla en 2015, y alumna de Máster en Biotecnología sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide. Durante los años 2014/15 delegada de alumnos de la Facultad de Farmacia de la US.

Dendrimeros y sus aplicaciones biomédicas

M^a Auxiliadora Pérez Repiso

Resumen— Los dendrimeros son un tipo de polímeros hiperramificados que se caracterizan por su versatilidad, ya que los grupos funcionales presentes en la periferia pueden ser modificados uniéndoles moléculas de interés. De esta manera, podemos dotarlos de propiedades interesantes, como la capacidad de atravesar las membranas celulares, lo que los convierte en vectores ideales para el transporte de fármacos y genes. Además de estas aplicaciones, existen otras como es el uso de los dendrimeros en biosensores, agentes de diagnóstico, antitumorales... Aunque su uso en clínica todavía aún no está desarrollado, la mejora de sus propiedades físico-químicas va a hacer que los dendrimeros se conviertan en candidatos prometedores para aplicaciones clínicas.

Palabras Claves— Antitumoral, Dendrimer, Liberación controlada.



1. INTRODUCCIÓN

Los polímeros naturales, así como los sintéticos, siempre han fascinado a los científicos. Los polímeros sintéticos, y en particular los polímeros biodegradables, han mejorado las aplicaciones de los sistemas de administración de fármacos. En este contexto, los dendrimeros se han convertido en uno de los nanotransportadores poliméricos más prometedores para las áreas biomédicas.

Los dendrimeros se definen como macromoléculas globulares sintéticas. Su arquitectura característica proporciona una estructura ramificada bien definida con forma globular que hace que un gran número de grupos funcionales se puedan añadir en forma de plantilla para obtener la aplicación de interés. Dicha arquitectura está formada por tres dominios diferentes (Figura 1): un núcleo central que consiste en un átomo o molécula, un manto constituido por unidades de repetición repartidas en una serie de capas concéntricas denominadas “generaciones” y una corona ramificada con grupos funcionales terminales, los cuales son de vital importancia para determinar las propiedades de los dendrimeros [1],[2].

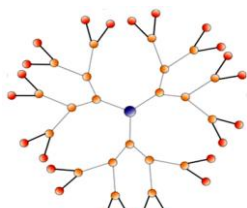


Figura 1: Representación esquemática de la estructura de un dendrimer: núcleo (azul), manto (naranja) y grupos funcionales (rojo).

Extraída de Chaplot, S. P., & Rupenthal, I. D. (2014) [2].

2. PROPIEDADES

La arquitectura dendrítica tiene un inmenso potencial sobre el resto de los sistemas de soporte, en particular en el campo de la administración de fármacos, debido a sus propiedades únicas. En comparación con los polímeros lineales tradicionales, los dendrimeros mejoran significativamente sus propiedades físicas y químicas [1].

Entre sus propiedades podemos destacar los siguientes apartados:

2.1. Tamaño y carga de los grupos funcionales

Los dendrimeros poseen un tamaño uniforme y bien definido, que junto con su forma hacen que sean de gran interés en aplicaciones biomédicas debido a su capacidad para atravesar las membranas celulares en función de su recubrimiento, así como de ser un soporte perfecto de péptidos antigénicos en el diseño de estrategias de vacunación.

Los grupos terminales pueden tener cargas positivas, negativas o neutras. Esta polivalencia puede ser explotada, jugando un papel importante en la aplicación de los dendrimeros, como son los dendrimeros catiónicos, por ejemplo, PPI y PAMAM... que pueden formar complejos con el ADN cargado negativamente, mientras que los dendrimeros con cargas positivas facilitan su interacción con membranas biológicas con carga negativa que conducen a la aplicabilidad de los dendrimeros para la administración intracelular de fármacos, proporcionando un campo potencial [1], [3].

2.2. Monodispersidad

Los dendrimeros son una clase de polímeros que pueden ser construidos como una estructura molecular bien definida, es decir, monodispersa, a diferencia de los polímeros lineales. Esta monodispersidad ofrece la posibilidad de ser una herramienta escalable, bien definida y reproducible [1].

2.3. Biocompatibilidad y toxicidad

La toxicidad de los dendrimeros se atribuye principalmente al grupo funcional presente en su periferia. Generalmente la toxicidad y hemólisis de los dendrimeros depende de la concentración, aunque los dendrimeros con grupos terminales neutros o aniónicos han mostrado comparativamente menor toxicidad y hemólisis [4].

3. SINTESIS

Existen varios métodos por los que se sintetizan dendrimeros, aunque los más usados para su síntesis son.

3.1. Enfoque divergente

Este tipo de síntesis fue desarrollado por Tomalia, en la cual se parte desde el núcleo interno a través de dos pasos: en primer lugar se activan los grupos funcionales de la superficie, y en segundo lugar se adiciona unidades de monómero de ramificación. Para ello, el núcleo se hace reaccionar con un reactivo, seguido de la eliminación de los grupos protectores. Esto conducirá a la formación de dendrímeros de primera generación, y si se repite, obtenemos dendrímeros del tamaño deseado [1], [2].

3.2. Enfoque convergente

Este tipo de síntesis fue desarrollado por Hawker y Fréchet. Comienza en la periferia del dendrímero y se mueve hacia el interior mediante el acoplamiento progresivo de unidades activas de superficie. Implica dos etapas: en primer lugar un acoplamiento reiterativo de protección / desprotección para producir un dendrón (componente periférico) funcionalizado; y en segundo lugar, el núcleo [1], [2].

Comparando ambos procesos, la síntesis divergente proporciona una mejor capacidad de modificación de los grupos de la superficie y, además, el impedimento estérico no interfiere en las reacciones ya que éstas se producen en la periferia. Sin embargo, la síntesis convergente presenta la ventaja de que requiere menos pasos, aunque está muy limitada ya que requiere la protección del sitio activo. Por ello, la síntesis divergente es más adecuada para obtener dendrímeros con un elevado número de generaciones [1].

Hasta la fecha, se han sintetizado más de 100 familias de dendrímeros estructuralmente diferentes en base a estos dos enfoques y, además, se han implementado modificaciones de los métodos descritos para hacer la síntesis más eficiente y reproducible.

4. APLICACIONES BIOMÉDICAS

El diseño y desarrollo de los dendrímeros en las aplicaciones biomédicas se acelera cuando tenemos en cuenta sus propiedades excelentes en medio fisiológico.

Para poder usar los dendrímeros en dichas aplicaciones deben de cumplir una serie de requisitos: a) no tóxicos, b) no inmunogénicos, c) atraviesen las barreras (intestinal, vasos sanguíneos o las membranas celulares), d) capaces de permanecer en circulación durante el tiempo necesario para tener un efecto clínico [5].

4.1. Dendrímeros para transporte y liberación controlada

El control preciso de la distribución de medicamentos es muy valioso para abolir los inconvenientes típicos de la medicina tradicional. Por lo tanto, un sistema de suministro de medicamentos debe estar diseñado para lograr la entrega específicamente en el sitio de interés. En los últimos años, la mejora de la farmacocinética, biodistribución y la liberación controlada del fármaco al sitio diana específico se ha logrado mediante la administración de fármacos a base de polímeros. Por ello, los dendrímeros han recibido una considerable atención en aplicaciones

biológicas [6].

Un ejemplo es la conjugación de dendrímeros PAMAM con ácido fólico seguido del acoplamiento con metotrexato (MTX) contra el cáncer. Este sistema ha sido evaluado mediante estudios de biodistribución y microscopía confocal en ratones inmunodeficientes con carcinoma. En dichos estudios, los dendrímeros conjugados con ácido fólico mostraron tres veces mayor acumulación en las células tumorales después de 24 h en comparación con los conjugados sin ácido fólico. Por ello, los dendrímeros proporcionan una plantilla con la que es posible conjugar más de un ligando para diferentes propósitos permitiendo a su vez una liberación controlada del fármaco [7], [8].

4.2. Dendrímeros como antitumorales

Con el objetivo de superar las limitaciones en el tratamiento del cáncer, hay una necesidad urgente en la elaboración de vectores seguros y eficaces que puedan proteger la carga útil de la degradación durante el transporte, mejorar la eficiencia, optimizar los perfiles de liberación del fármaco y reducir los efectos tóxicos. En este sentido, ya están disponibles varios sistemas de transporte para la terapia contra el cáncer, entre ellos, los dendrímeros, usados en la entrega de una amplia gama de fármacos.

Un ejemplo es el uso de dendrímeros 5.0G PPI-polisorbato conjugado con el anticancerígeno DTX (doce-taxel) dirigidos a tumores cerebrales. Dicho estudio reveló que tras el tratamiento, el volumen del tumor se redujo más de 50% [7].

Otro ejemplo es el uso de dendrímeros funcionalizados que actúan como agentes anti-VIH de dos maneras: primero, evitan la unión del VIH a la célula huésped, ya que incluyen tres sitios de unión potenciales: receptores CD4, glicoesfingolípidos (GSL) y receptores específicos de ICAM-3 de células dendríticas (DC-SIGN); y en segundo lugar, evitan la replicación del VIH en células huésped, afectando a la transcripción reversa del ARN y a la integración en el ADN de la célula huésped.

Se han estudiado diversos tipos de dendrímeros, como PAMAM y polianiónicos conjugados con varias drogas como AZT, inhibidores de la transcripción reversa, péptidos derivados de p24...; observándose una reducción en la replicación del virus en grandes proporciones[9].

4.3. Dendrímeros como agentes de diagnóstico

La morfología singular de los dendrímeros les hace un candidato prometedor para las aplicaciones de diagnóstico, por lo que se han utilizado eficientemente como agente de imagen, en radioterapia, como rayos X y resonancia magnética de contraste, así como sondas moleculares.

Un ejemplo ha sido la formación de complejos entre el gadolinio (III) (Gd), agente de contraste paramagnético y dendrímeros poliéster pegilados. En las últimas décadas, este sistema ha sido útil para visualizar la vasculatura de los tumores y la participación linfática, produciéndose un mayor contraste que el producto disponible en el mercado Magnevist®, además de que la retención en todos los órganos resulta más baja, por lo que se reduce la toxicidad inducida por Gd. Por lo que una mejora en el contraste de imágenes por resonancia magnética y la baja reten-

ción de Gd hace que este dendrímero biodegradable sea un buen vehículo como agente de imagen [6].

4.4. Dendrímeros para la transferencia de genes

La transferencia de genes es una herramienta invaluable experimental que implica la introducción de nuevo material genético para el tratamiento de enfermedades. Entre los diversos dendrímeros disponibles comercialmente, los dendrímeros PAMAM han recibido la mayor atención como agentes de liberación de genes no virales debido a su naturaleza catiónica para la entrega de los materiales genéticos incluyendo oligonucleótidos, genes, aptámeros, siRNA, etc [7].

Un ejemplo es la formación de dendrímeros PAMAM con un núcleo de trietanolamina (TEA), formando nanopartículas estables para proteger siRNA de la degradación por RNAsas. El potencial de estos dendrímeros como vectores para la entrega de siRNA se demostró en un modelo de luciferasa y en un modelo de cáncer de próstata. En este caso, se proporcionó de manera eficiente siRNA en células T humanas y células mononucleares de sangre periférica primarias (PBMC), mostrando un silenciamiento génico eficaz y una actividad anticancerígena, ya que se observa una disminución de la proteína de choque térmico 27 (Hsp27) y de la actividad contra el cáncer inducida por apoptosis dependiente de caspasas [10].

4.5. Dendrímeros como biosensores

Otra aplicación de los dendrímeros son los sistemas de biodetección (biosensores) fabricados mediante la combinación de electrodos y elementos de reconocimiento molecular (enzimas y anticuerpos). En este sentido, una configuración muy utilizada en medicina y biotecnología son los ensamblajes capa por capa (LbL) a base de dendrímeros.

Por ejemplo, es el caso de los sensores LbL basados en dendrímeros con ftalocianina tetrasulfonada (TsPc) sensible al pH, la humedad, y a la glucosa. En este caso, el alto rendimiento de los sensores de FET se ha atribuido a la estructura porosa de las películas LbL TSPC / dendrímero permeable a H⁺ y a la glucosa [11].

Otro ejemplo es la generación de biosensores de penicilina basándose en películas LbL de dendrímeros. Estas películas LbL están formadas por capas alternativas de nanotubos de carbono carboxilados y dendrímeros PAMAM. Dicho sensor es sensible a intervalos de concentraciones de $5,0 \times 10^{-6}$ a $2,5 \times 10^{-2}$ M de penicilina [12].

5. CONCLUSIONES

Las características altamente controlables tales como su tamaño, forma y funcionalidad de la superficie hacen a los dendrímeros un componente versátil en una amplia gama de aplicaciones biomédicas.

En dicho artículo se han descrito las oportunidades que ofrecen los dendrímeros en la resolución de los problemas fundamentales como son la administración de fármacos, la orientación de las moléculas del fármaco, transferencia génica, diagnóstico... A pesar de esto, su uso está limitado debido a su alto coste de fabricación y además no están sometidos a la condición de GRAS debi-

do a los problemas de toxicidad inherentes.

Por ello, su uso en clínica todavía no ha alcanzado el éxito de los polímeros lineales, aunque con la mejora de la síntesis y de sus características como la toxicidad, los dendrímeros se convertirán en candidatos prometedores para una mayor explotación en el descubrimiento de fármacos y aplicaciones clínicas.

REFERENCIAS

- [1] Kesharwani, P., Jain, K., & Jain, N. K. "Dendrimer as nanocarrier for drug delivery", *Progress in Polymer Science*, 39(2), 268-307, 2014. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005.
- [2] Chaplot, S. P., & Rupenthal, I. D. "Dendrimers for gene delivery—a potential approach for ocular therapy?", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(4), 542-556, 2014. Doi: 10.1111/jphp.12104.
- [3] Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., ... & Pashaei-Asl, R. "Dendrimers: synthesis, applications, and properties", *Nanoscale research letters*, 9(1), 247-257, 2014. Doi: 10.1186 / 1556-276X-9-247.
- [4] Shcharbin, D., Janaszewska, A., Klajnert-Maculewicz, B., Ziemba, B., Dzmitruk, V., Halets, I., ... & Bryszewska, M. "How to study dendrimers and dendriplexes III. Biodistribution, pharmacokinetics and toxicity in vivo", *Journal of Controlled Release*, 181, 40-52, 2014. Doi: 10.1016 / jjconrel.2014.02.021.
- [5] Martinho, N., Florindo, H., Silva, L., Brocchini, S., Zloh, M., & Barata, T. "Molecular Modeling to Study Dendrimers for Biomedical Applications", *Molecules*, 19(12), 20424-20467, 2014. Doi:10.3390 / molecules191220424.
- [6] Madaan, K., Kumar, S., Poonia, N., Lather, V., & Pandita, D. "Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues", *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6(3), 139-150, 2014. Doi: 10.4103 / 0.975-7.406,130965.
- [7] Kesharwani, P., & Iyer, A. K. "Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery", *Drug discovery today*, 1-12, 2015. Doi: 10.1016 / j.drudis.2014.12.012.
- [8] Prabhu, R. H., Patravale, V. B., & Joshi, M. D. "Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights", *International journal of nanomedicine*, 10, 1001-1018, 2015. Doi:10.2147/IJN.S56932.
- [9] Peng, J., Wu, Z., Qi, X., Chen, Y., & Li, X. "Dendrimers as potential therapeutic tools in HIV inhibition", *Molecules*, 18(7), 7912-7929, 2013. Doi:10.3390/molecules18077912.
- [10] Wu, J., Huang, W., & He, Z. "Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: a review", *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16, 2013. http://dx.doi.org/10.1155/2013/630654.
- [11] Lombardo, D. "Modeling Dendrimers Charge Interaction in Solution: Relevance in Biosystems", *Biochemistry research international*, 2014. http://dx.doi.org/10.1155/2014/837651.
- [12] Sato, K., & Anzai, J. I. "Dendrimers in layer-by-layer assemblies: synthesis and applications", *Molecules*, 18(7), 8440-8460, 2013. doi:10.3390/molecules18078440.



Mª Auxiliadora Pérez Repiso recibió el título de graduada en Biotecnología por la Universidad de Murcia en 2014. Actualmente es estudiante del Master en Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide.

THC, cannabis y el sistema endocannabinoide: un breve resumen

Alejandro Peralta García

Resumen— En este artículo abordamos el funcionamiento del sistema endocannabinoide y la acción que tienen las moléculas cannabinoideas como el THC sobre este sistema. También repasamos someramente algunos de los efectos que producen el consumo de cannabis en el organismo.

Palabras Claves— Cannabidiol, cannabis, sinapsis, sistema endocannabinoide, THC.

1. INTRODUCCIÓN

Desde los albores de la civilización el cannabis ha sido usado con fines recreativos debido a su actividad psicotrópica, siendo los orientales los primeros en documentar su actividad terapéutica apenas en el siglo II DC. Sin embargo, no fue hasta principios del siglo XIX cuando se estudió por primera vez estos efectos usando el método científico. Fue llevado a cabo por Sir William B., un físico irlandés, que demostró la aparente utilidad del cannabis frente al cólera, problemas reumatológicos y otras enfermedades. [1]

Desde entonces, se ha estudiado el mecanismo de acción de esta sustancia psicoactiva proveniente de la planta *Cannabis sativa*, cuyo componente más activo es el Δ^9 -tetrahidrocannabinol, el THC, que fue aislado en los 60. Gracias a la búsqueda de los receptores de estas sustancias se descubrió el sistema endocannabinoide (cuyo nombre proviene de la planta), un sistema que utilizan los mamíferos para regular el apetito, el dolor y la memoria, entre otras funciones. Este sistema para la comunicación intercelular utiliza moléculas estructuralmente similares a los cannabinoideas, pero producidas en el interior del organismo: los endocannabinoideas. [2]

2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El sistema endocannabinoide comprende los cannabinoideas endógenos (endocannabinoideas), las enzimas implicadas en la síntesis y degradación de estas moléculas y, por último, sus receptores. Los endocannabinoideas son moléculas lipídicas que usualmente se encuentran en las membranas celulares y que actúan como mensajeros moleculares. Sus dos mayores representantes son la araquidonoiletanolamida o anandamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Son liberados mediante dos pasos enzimáticos rápidos, normalmente por la activación de GPCRs o por despolarización. Esa es una de las diferencias con los neurotransmisores: los endocannabinoideas no son sintetizados previamente y almacenados en vesículas, sino que se sintetizan y liberan bajo demanda. [2]

Los receptores de estas moléculas se denominan CB1 y CB2. Los CB1 son abundantes en el sistema nervioso central, especialmente en zonas como el cortex, el hipo-

campo y el cerebelo, y suelen estar presentes en los extremos terminales de los axones. Los CB2 muestran niveles inferiores en el sistema nervioso central, predominando en la microglía y en los elementos vasculares. Son GPCRs con cuya activación se inhiben las adenylicilasa (que producen el AMP cíclico, segundos mensajeros), algunos canales de calcio dependientes de voltaje y activan kinasas que regulan los canales de potasio. En general, la activación de estos receptores altera la sinapsis, normalmente inhibiendo el impulso nervioso, y regula transcripciones de genes y la motilidad celular. [2]

Los endocannabinoideas probablemente sean mensajeros retrógrados. Esto se cree por la posición pre-sináptica que toman los receptores CB1 en el axón, por su actividad inhibitoria de la sinapsis, por la localización post-sináptica de las enzimas que sintetizan los endocannabinoideas y por el hecho de que la actividad post-sináptica aumenta la producción de estas sustancias. [2]

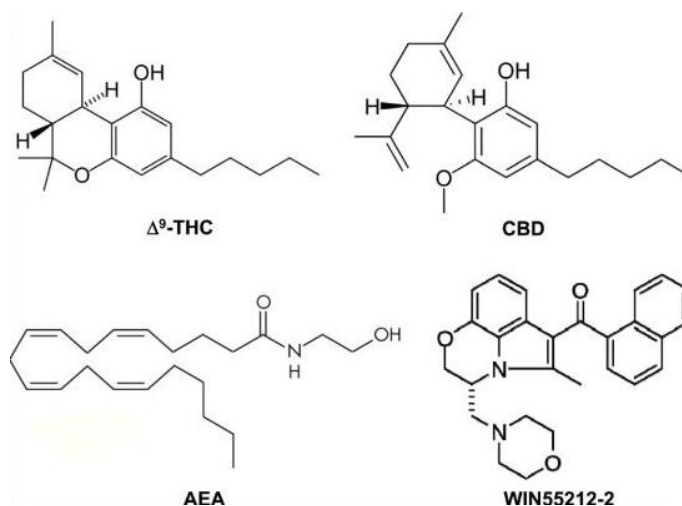


Fig 1. Cuatro agonistas de los receptores cannabinoideas. WIN55212-2 es un fuerte agonista que se ha usado para estudiar las características de este sistema. [9]

Para regular los niveles de endocannabinoides actúan las enzimas desactivadoras de endocannabinoides: fatty acid amide hydrolase (FAAH) para AEA y monoacylglycerol lipase (MGL) para 2-AG. [3]

3. RELACIÓN CON EL CANNABIS

Hay más de sesenta cannabinoides presentes en la marihuana, de los cuales dos de ellos son los más estudiados: el THC y el cannabidiol (CBD). El primero es el que mayores efectos psicoactivos ha reportado, pero además de propiedades euforizantes tiene propiedades analgésicas, antieméticas, antiinflamatorias y antioxidantes. Tiene gran afinidad por los receptores endocannabinoides a diferencia del cannabidiol, con una baja afinidad por ambos, CB1 y CB2. Curiosamente, éste último tiene propiedades ansiolíticas, antipsicóticas y anticonvulsivas, contrarrestando en parte los efectos psicoactivos del THC. Por ello, plantas con un contenido alto en CBD y bajo en THC se han usado para tratar epilepsias. [4]

El THC es altamente lipófilo y tras ser inhalado se absorbe rápidamente a la sangre desde el humo de la combustión (en caso de fumarla), con picos de concentración en plasma a los 10 minutos. En la sangre, el THC se adhiere principalmente (90%) a proteínas del plasma como lipoproteínas y albúminas. Solo un 10% se localiza en los glóbulos rojos. El THC se expande rápidamente a través de los vasos sanguíneos llegando a los tejidos altamente vascularizados, como los pulmones, el hígado, los riñones, el corazón... Solo un 1% de la dosis en sangre se ha detectado en el cerebro en el momento álgido del efecto psicoactivo. Con el tiempo, el THC se va acumulando en tejidos menos vascularizados y finalmente en el tejido adiposo (por su lipofilia). [4]

El THC es una molécula tridimensionalmente similar a la anandamida, con la diferencia de que el mensajero producido naturalmente es fácilmente removible y degradable y así se disipan sus efectos, a diferencia del THC, cuyos efectos persisten durante horas tras su consumición, manteniéndose ligados a los receptores y continuamente emitiendo la señal. Esta molécula se une a los receptores CB1 y en menor medida a CB2, inhibiendo la sinapsis mediante la activación de canales de potasio que disminuyen la duración del potencial eléctrico, disminuyendo así la cantidad de neurotransmisores liberados, o también inhibiendo la liberación de calcio, entre otros efectos. [5]

Para analizar a fondo los efectos de esta sustancia sobre las sinapsis excitadoras se usó β -ciclodextrina, una sustancia que solubiliza drogas hidrofóbicas formando polímeros en forma de anillos de seis, siete y ocho monómeros, lo que mejora el transporte de la molécula apolar. Así, se observaron diferentes propiedades de la droga en el organismo, como su funcionamiento como agonista de los receptores CB1 inhibiendo la sinapsis de glutamato en el hipocampo. Sin embargo, otros estudios han demos-

trado que el THC puede bloquear los efectos de los cannabinoides más agonistas tanto endógenos como exógenos. Además, en otro estudio, una dosis prolongada (19 horas) de THC a neuronas del hipocampo desensibilizaron los receptores CB1 en los terminales de transmisión del glutamato, sugiriendo que el THC puede antagonizar los efectos de los agonistas principales y desregularlos. Esto nos revela que el efecto del THC no solo se debe a la activación de los receptores CB1, sino también al antagonismo de los endocannabinoides, es decir, la no-activación de los receptores. [5]

La sinapsis inhibitoria también se ha estudiado usando la β -ciclodextrina en la sinapsis de GABA, llegando a la conclusión de que en estas sinapsis el THC actúa como un agonista principal, inhibiendo la transmisión de inhibidores. Esto se debe a la mayor presencia de receptores CB1 en las sinapsis inhibitorias que en las excitadoras, lo que demuestra que la actividad de agonista parcial se observa cuando la concentración de receptores es baja. Esta diferencia entre la modulación de las sinapsis inhibitorias y excitadoras lleva a la disrupción de la actividad del hipocampo, lo que provoca el efecto de la consumición de marihuana. Además, el THC inhibe la absorción del glutamato, mientras que no afecta a la de GABA. Esto potencia el hecho de que la modulación de las sinapsis no es igual en todas las sinapsis. [5]

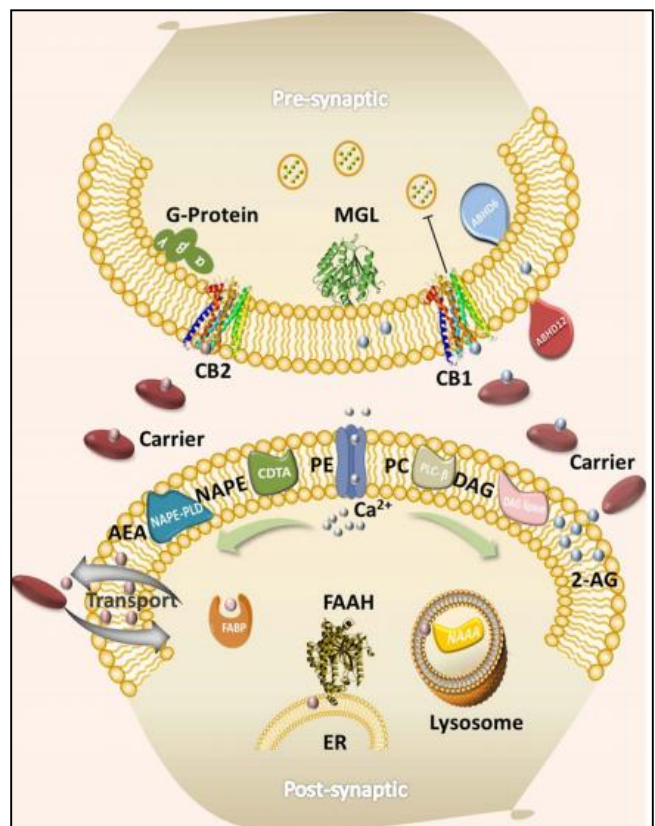


Fig 2. Ilustración esquemática del sistema endocannabinoide en acción. [3]

4. EFECTOS FISIOLÓGICOS

La consumición de THC tiene efectos terapéuticos, como se ha comentado anteriormente. Por ello, se prescribe principalmente como calmante del dolor, además de tener otros efectos aparentemente positivos. Esto lleva años provocando un fuerte debate sobre la legalización de esta droga en diversos países, debate que está más que candente en países como EEUU. Por la subjetividad de este asunto, este artículo no ahondará demasiado en estos efectos, pero vamos a repasar algunos tanto positivos como adversos debido al consumo del cannabis.

El efecto analgésico del cannabis es una de las principales razones por las que se receta éste. Sin embargo, solo es recomendable en pacientes con dolores neuropáticos severos y que no han respondido a analgésicos estándares y cannabinoides sintéticos. Se recomienda no consumirlo en menores de 25, mujeres embarazadas, personas con un historial familiar de psicosis o pacientes con problemas vasculares o respiratorios, ya que el consumo de cannabis afecta al ritmo cardíaco entre otros efectos.[6]

En un estudio del efecto del THC sobre pacientes con náuseas y vómitos inducidos por la quimioterapia se observó que 14 de 15 pacientes administrados con THC y cannabis tuvieron una mejoría en estos síntomas comparados con el placebo, demostrando su actividad antiemética.[4]

También se han hecho estudios sobre la utilización del cannabis como tratamiento contra la anorexia asociada al SIDA, por su actividad incrementando el importe calórico de los alimentos y el apetito, ya que como dijimos el sistema endocannabinoide regula el apetito.[4] Sin embargo, según otro autor, muchos estudios han sido de corta duración, en un número disminuido de pacientes y basándose en mediciones a corto plazo, por ello pierden fiabilidad.[7]

Otros efectos secundarios probables incluyen un incremento en la conductancia de aire a los pulmones y una disminución de la presión intraocular, además de las alteraciones sensoriales por su actividad psicotrópica. Los consumidores habituales pueden experimentar un descenso de la frecuencia cardíaca y presión sanguínea baja. También se ha documentado fibrilaciones auriculares y taquicardias ventriculares, y un incremento del riesgo en infarto de miocardio en los sesenta minutos posteriores al uso del cannabis. Sin embargo, no se puede obtener información completamente veraz debido a que los consumidores de cannabis suelen consumir también tabaco y mezclar sus efectos. [8]

Los efectos a largo plazo no están claros por la falta de precisión de los datos que aportan los consumidores y la posibilidad de confundir síntomas con otros causantes. También se ha asociado usualmente el consumo de cannabis con enfermedades psicóticas, pero la relación entre

ambos hechos es débil. Sí se ha demostrado que, con pacientes con otros factores como polimorfismo genético, el cannabis aumenta el riesgo de esquizofrenia [8]

5. CONCLUSIÓN

Aún queda mucho por investigar sobre el sistema endocannabinoide para conocer mejor los principios biológicos que llevan a los efectos del cannabis. Es una investigación relativamente reciente y aún se desconocen muchos de los aspectos que regulan este tipo de comunicación intercelular. Con los avances en este campo se podrán crear mejores fármacos minimizando los efectos secundarios, ya que sus propiedades positivas son evidentes, aunque, como ocurre con cualquier fármaco, tiene sus efectos secundarios, algunos más estigmatizados.

REFERENCIAS

- [1] V. Di Marzo, "A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 27, no. 3, pp. 134-40, Mar. 2006.
- [2] H.-C. Lu and K. Mackie, "An introduction to the endogenous cannabinoid system," *Biol. Psychiatry*, vol. 79, no. 7, pp. 516-525, Oct. 2015.
- [3] V. K. Vemuri and A. Makriyannis, "Medicinal chemistry of cannabinoids," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 97, no. 6, pp. 553-8, Jun. 2015.
- [4] J. L. Kramer, "Medical marijuana for cancer," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 65, no. 2, pp. 109-22, Mar. 2015.
- [5] A. F. Hoffman and C. R. Lupica, "Synaptic targets of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the central nervous system," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 8, Aug. 2013.
- [6] M. Kahan, A. Srivastava, S. Spithoff, and L. Bromley, "Prescribing smoked cannabis for chronic noncancer pain: preliminary recommendations," *Can. Fam. physician Médecin Fam. Can.*, vol. 60, no. 12, pp. 1083-90, Dec. 2014.
- [7] E. E. Lutge, A. Gray, and N. Siegfried, "The medical use of cannabis for reducing morbidity and mortality in patients with HIV/AIDS," *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. 4, p. CD005175, Jan. 2013.
- [8] J. G. Rella, "Recreational cannabis use: pleasures and pitfalls," *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 82, no. 11, pp. 765-72, Nov. 2015.
- [9] V. C. and D. P. Marta Solinas, *Molecular Considerations and Evolving Surgical Management Issues in the Treatment of Patients with a Brain Tumor*. InTech, 2015.



Alejandro Peralta García es estudiante de primer año de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide

Agentes antitumorales a partir de metabolitos de organismos marinos

Lucía Reseco Calderón

Resumen—El océano cubre el 70% de la superficie de nuestro planeta, y su biodiversidad es muy superior a la existente en la tierra. A pesar de ello, estos ecosistemas están casi inexplorados desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos químicos. Los productos naturales de origen marino poseen con frecuencia estructuras y mecanismos de acción biológica especialmente interesantes en la búsqueda de nuevos fármacos o agentes antitumorales.

Palabras Claves—Agentes antitumorales Cáncer, Metabolitos marinos, Organismos marinos, Tumores



1. INTRODUCCIÓN

Las células humanas crecen y se dividen a medida que el cuerpo las necesita. Cuando estas células envejecen o se dañan, se inicia un mecanismo de apoptosis. Podríamos definir este mecanismo como un sistema de muerte celular programada. Bien es cierto que el número de células en un organismo debe estar estrictamente controlado, por lo que el cuerpo humano debe generar nuevas células que reemplacen a aquellas que por un motivo u otro se degradan. En aquellas células en las que se acumula una gran cantidad de daño celular, este proceso se descontrola, y no se llevan a cabo los procesos de apoptosis. De esta forma, este conjunto de células sobreviven cuando deberían morir y además, se dividen sin interrupción llegando a formar grandes masas celulares a las que llamamos tumores.

2. CÁNCER

Cáncer es el nombre que reciben un conjunto de enfermedades relacionadas. Todas ellas tienen en común lo siguiente: algunas células del cuerpo comienzan a dividirse de forma descontrolada e invaden los tejidos que las rodean. Muchos cánceres forman tumores sólidos, aunque existen excepciones como el caso de las leucemias (cánceres de la sangre). Al igual que el resto de células del organismo, las células tumorales necesitan oxígeno y nutrientes para sobrevivir, por lo que estas células deben estar irrigadas por gran cantidad de capilares y vasos sanguíneos. La angiogénesis es el proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. A través de estos vasos transportadores las células tumorales pueden colonizar otros tejidos, extendiendo la enfermedad a otras partes del cuerpo humano. Este proceso es lo que llamamos metástasis tumoral. [1]

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados. Según las estadísticas, en los próximos

treinta años una de cada tres personas se verá afectada por esta enfermedad y un 20-25% fallecerá por este motivo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que el número de pacientes diagnosticados ascenderá a 15,5 millones en 2030, y se producirán un total de 11,5 millones de defunciones. [2]

3. TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

A diferencia de lo que ocurre en otros tratamientos terapéuticos, la quimioterapia contra el cáncer está dominada por productos naturales. Se estima que una alta proporción de los futuros tumores serán resistentes a los agentes antineoplásicos, también llamados citotóxicos o anticancerígenos [2]. Por lo tanto, actualmente hay abiertas numerosas líneas de investigación para desarrollar agentes que superen esta resistencia. Entre ellas destaca la búsqueda de nuevos agentes antitumorales en fuentes de origen marino. Los productos naturales de origen marino poseen estructuras y mecanismos únicos, con características muy especiales.

Podemos clasificar los organismos marinos en cinco grandes grupos, en base a los metabolitos secundarios que estos generan: esponjas, celentéreos, moluscos, tunicados y equinodermos. La evolución de dichos organismos se ha dirigido a la producción de sustancias químicas con las que interactuar con el entorno. Entre ellas destaca el desarrollo de compuestos citotóxicos para defenderse de posibles ataques o infecciones por parte de otros organismos. En base a esta línea de metabolitos secundarios generados por los organismos marinos se ha centrado la búsqueda de nuevos agentes antitumorales en los últimos años. [3]

4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE AGENTES ANTITUMORALES

Los mecanismos de acción citotóxica de los agentes antitumorales de origen marino son muy complejos. Por este motivo, destacaremos tan solo algunos de ellos [3]

- Inhibición del proceso de angiogénesis, que es esencial para el crecimiento y desarrollo de los tumores.
- Inducción del proceso de apoptosis, a través de diversos mecanismos.
- Inhibición de proteínas reguladoras del ciclo celular, como por ejemplo las quinasas dependientes de ciclinas (abreviadas como CDK), las quinasas de "checkpoint" (Chk) y las fosfatasa de especificidad dual.
- Algunos inhibidores actúan inhibiendo la etapa de fijación de las topoisomerasas al ADN. Estas proteínas actúan sobre el ADN, rompiendo una o las dos hebras y volviendo a unir estas tras un giro. El mecanismo de acción más característico de este tipo de inhibidores es su actuación como agentes intercalantes. En este caso se forma un complejo ternario estable ADN-topoisomerasa-inhibidor, que impide la actuación de la proteína.
- Una de las dianas más habituales de antitumorales de origen marino son los microtúbulos. Estos están compuestos por la agregación de heterodímeros de tubulina, en los que existen sitios de unión de algunos antitumorales. Otros antitumorales inhiben la despolimerización de la tubulina.
- El ADN es otra de las dianas de antitumorales marinos. Algunos agentes antitumorales promueven la formación de especies reactivas de oxígeno, deforman la molécula de ADN mediante uniones por enlaces covalentes al surco menor de esta, impiden la actuación de diversas enzimas de unión específica al ADN.

cerebral, ya que aparentemente favorece la formación de nuevas conexiones cerebrales. Por otra parte, la briostatina también podría emplearse para tratar a personas con secuelas en sus capacidades cognitivas tras haber sufrido un infarto cerebral [4].

La baja concentración de briozoos hace inviable su extracción y producción a gran escala. Su primer ensayo clínico se llevó a cabo por el NCI (EE.UU.), siendo necesario recolectar 13 toneladas de organismo y la utilización de técnicas cromatográficas a gran escala para obtener 18 gramos de compuesto para el estudio clínico inicial. La solución a este problema ha sido el diseño de más de cien sustancias análogas más simples, y por tanto más fáciles de sintetizar.

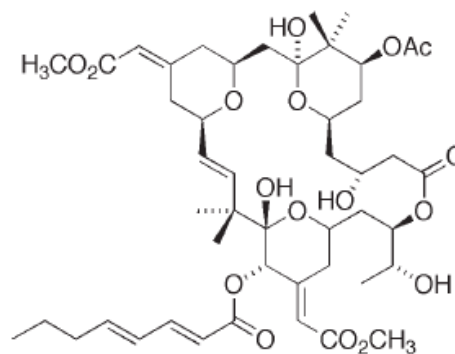


Fig 2. Fórmula molecular de la briostatina.

5.2. Zalypsis®

Se trata de un alcaloide isoquinólico sintético cuya estructura está relacionada con el compuesto natural marino Jorumycina y la familia de Renieramycinas, que se derivan de moluscos y esponjas, respectivamente. Zalypsis produce efectos citotóxicos que dependen de su unión al ADN, pero no están asociados con los daños genéticos.

En estudios preclínicos, esta sustancia ha evidenciado una actividad antitumoral potente tanto "in vitro" como en modelos "in vivo", demostrando también un perfil toxicológico de tolerabilidad aceptable [5]. Tras diversos estudios se han demostrado los efectos positivos de la administración de este medicamento mediante infusiones intravenosas en pacientes con cáncer metastásico de cuello de útero o endometrio, que han sido tratados previamente con quimioterapia. Destaca su actividad en el tratamiento de tumores humanos mamarios, gástricos, prostáticos y renales implantados en ratones.

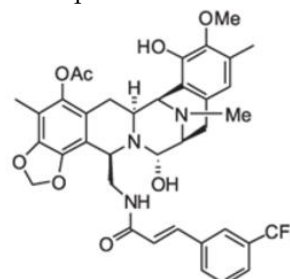


Fig 3. Fórmula molecular de Zalypsis®

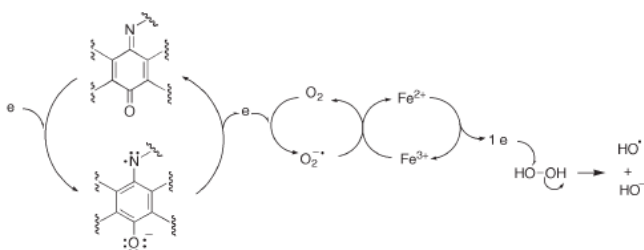


Fig 1. Mecanismo de generación de especies reactivas oxigenadas por algunos compuestos de origen marino.

5. AGENTES ANTITUMORALES DESTACADOS

5.1. Briostatina

La briostatina fue aislada por primera vez en 1960 a partir del briozoo *Bugula neritina*. Las briostatinas son un grupo de lactonas macrocíclicas cuya estructura fue determinada en 1982. Actualmente se han aislado 20 tipos diferentes de briostatina. Esta sustancia actúa como modulador de la proteína quinasa C (PKC por sus siglas en inglés). Esta sustancia se une a una enzima que participa en la formación de las células. Actualmente se encuentra en estudio no solo para el tratamiento del cáncer sino también para otras enfermedades tales como el Alzheimer y el derrame

5.3. Trabectedina

La trabectedina forma parte del grupo de sustancias conocidas como ecteinascidinas y se describe molecularmente como la fusión de tres anillos tetrahydroisoquinolínicos. De forma natural se encuentra en la ascidia (*Ecteinascidia turbinata*), un invertebrado marino que se encuentra en el mar Caribe.

Esta sustancia se une selectivamente a la guanina (G) del ADN provocando una deformación de la estructura molecular de la hélice y consecuentemente, una alteración de los procesos del ciclo celular, que provocan la apoptosis celular [6]. Esta sustancia química se emplea como sustancia farmacológica y principio activo en tratamientos de quimioterapia indicados contra estadios avanzados del sarcoma de tejidos blandos (STT) y contra el cáncer de ovario.

Un preparado de trabectedina es actualmente comercializado con el nombre de Yondelis® por la empresa PharmaMar, del grupo Zeltia.

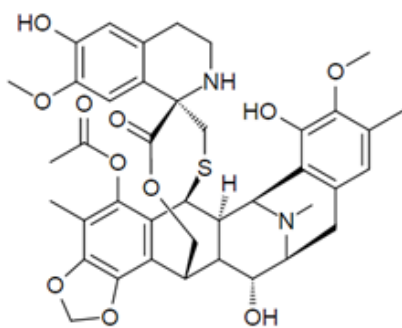


Fig 4. Fórmula molecular de la trabectedina.

5.4. Plitidepsina (Aplidin®)

La plitidepsina es un depsipéptido cíclico, es decir, un péptido cíclico en el que hay uno o más enlaces éster en lugar de enlaces peptídicos. Su estructura química es muy similar a la de la didemmina B. Esta sustancia también se conoce como deshidrodidemmina B, y se comercializa bajo el nombre Aplidin® por PharmaMar.

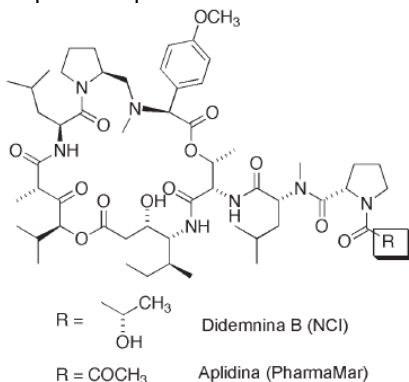


Fig 5. Fórmula molecular de la didemmina B y aplidina.

Aplidin es un agente antitumoral de origen marino, aislado originalmente del tunicado marino *Aplidium albi-*

cans. Este género pertenece a la especie de las ascidias, en concreto a la familia *Polyclinidae*. Tras diversos estudios se demostró que Aplidin redujo de forma significativa la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), necesario para la creación de nuevos vasos sanguíneos en células tumorales, por lo que inhibió el crecimiento de las mismas [7].

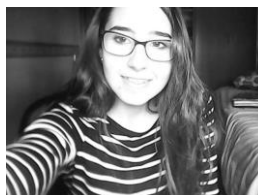
Actualmente está en fase de desarrollo II para el tratamiento de neoplasias malignas como linfoma de células T. Se encuentra en fase III de desarrollo para tratar el mieloma múltiple.

6. CONCLUSIONES

Estas líneas de investigación en la búsqueda de sustancias citotóxicas como agentes antitumorales en el medio marino son muy prometedoras. El mayor inconveniente sería quizás la insuficiente producción de forma natural de estos compuestos. Este hecho podría resolverse mediante la síntesis en los laboratorios de sustancias análogas, que podrían incluso mejorarse. De esta forma podrían obtenerse grandes cantidades de estos compuestos de una forma más sencilla y con la obtención de grandes cantidades de producto.

REFERENCIAS

- [1] Tsukamoto, S. (2016). Recent Progress in Study on the Biologically-Active Natural Products Search for Inhibitors of the Ubiquitin - Proteasome System from Natural Sources for Cancer Therapy. *Chemical and Pharmaceutical Bull.*, 64(2), 112-118.
- [2] Sabroso, C. M., & Suárez, A. I. T. (2013). Nuevas estrategias en terapia antitumoral basadas en la inducción de la apoptosis. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 79(2), 213-228.
- [3] Life on sea life yields drug leads _ Nature News.pdf. (n.d.). Menéndez, J. C. (2005). Nuevos antitumorales de origen marino. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 71(2), 341-363.
- [4] Malve, Harshad. "Exploring the Ocean for New Drug Developments: Marine Pharmacology." *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 8.2 (2016): 83-91. PMC. Web. 7 May 2016.
- [5] Petek, B.J.; Jones, R.L. PM00104 (Zalypsis®): A Marine Derived Alkylating Agent. *Molecules* 2014, 19, 12328-12335.
- [6] Larsen, A. K., Galmarini, C. M., & D'Incalci, M. (2016). Unique features of trabectedin mechanism of action. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(4), 663-671. <http://doi.org/10.1007/s00280-015-2918-1>
- [7] Galmarini, C.M.; D'Incalci, M.; Allavena, P. Trabectedin and Plitidepsin: Drugs from the Sea that Strike the Tumor Microenvironment. *Mar. Drugs* 2014, 12, 719-733.



Lucía Reseco Calderón.

Cursó estudios obligatorios y bachillerato en el I.E.S. Pedro de Valdivia (Vva. De La Serena, Badajoz). A la hora de redactar este artículo (curso 2015-2016) es alumna del primer curso del Grado de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide.

El papel del etileno en el proceso de maduración de los frutos

Marina Domínguez Quintero

Resumen— Los frutos llamados climatéricos, una vez recolectados, experimentan una masiva producción de etileno que acelera su maduración. Esto ocasiona grandes pérdidas económicas al sector hortofrutícola que busca continuamente sistemas para retardar la maduración y ampliar con ello la vida útil de los productos. Los avances en la investigación de este proceso hasta niveles de genoma y ADN abren un amplio campo de investigación.

Palabras clave— Etileno, frutos climatéricos, maduración, ERFs (factores de respuesta de etileno).

1. INTRODUCCION

Algunas veces nos hemos preguntado por qué las naranjas no son tan perecederas como las peras. Por qué la fruta madura tan rápido una vez se separa del árbol. O por qué cuando dejamos la fruta dentro de una bolsa de plástico se deteriora antes. Siempre se ha dicho que "una manzana podrida daña el barril completo". El responsable de que todo esto ocurra es el etileno, una sustancia gaseosa que se libera en el proceso de maduración de los frutos y que se ha venido a llamar la hormona de la maduración.

Los efectos del etileno ya eran conocidos en la China antigua, donde se sometían las peras a humo de incienso en sitios cerrados para acelerar su maduración. En Egipto se trataban los higos con gas con la misma finalidad. [1] En el siglo XIX en Alemania se vio que los árboles próximos a farolas con escapes de combustible perdían sus hojas. En 1901 se identificó el etileno entre los gases del alumbrado público, pero es en la década de los 80 cuando se estudia el proceso y se reconoce el papel del etileno como hormona de la maduración. [2]

En los frutos climatéricos se produce un rápido deterioro limitando los tiempos de comercialización de los productos, debido al etileno que se produce de forma masiva tras la cosecha.

2. EL PROCESO DE MADURACIÓN DE LOS FRUTOS

Según su comportamiento fisiológico, los frutos se han clasificado en dos grupos: [3]

Frutos climatéricos: acumulan almidón durante su crecimiento, el que se hidroliza a monosacáridos. Para ello, es necesaria una gran cantidad de energía, por lo que su tasa

respiratoria es muy alta. Entre ellos tenemos el tomate, el melocotón, la manzana, la pera, el melón y el plátano. [Fig.1]

Frutos no climatéricos: acumulan directamente monosacáridos durante su crecimiento y por ello no requieren tanta energía, por lo que su tasa respiratoria no va a variar significativamente durante la maduración. Se incluyen en este grupo los cítricos, la uva, la cereza y la calabaza.

Aunque se ha demostrado la participación del etileno en ambos grupos, es en los frutos climatéricos donde se observa un aumento significativo de su producción durante la maduración. La implicación del etileno en la maduración de la fruta es indudable y se demuestra porque si retiramos el etileno que se desprende durante su almacenamiento, se enlentece la maduración. De la misma forma, si aplicamos etileno exógeno durante el almacenamiento de la fruta se estimula su maduración. [3]

Climacteric fruit ripening involves a spike in respiration correlating with a burst of ethylene synthesis

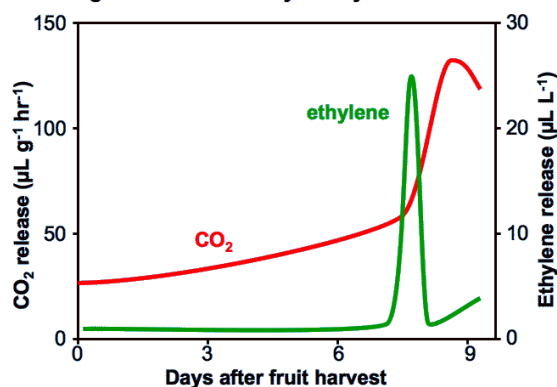


Fig. 1. Liberación de etileno y respiración en frutos climatéricos

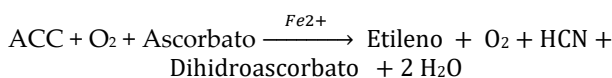
Además, en la regulación de la maduración intervienen otras hormonas. Así, los frutos recolectados verdes no maduran con normalidad, incluso si se tratan con etileno, necesitando estar conectados a la planta para finalizar su maduración. Los frutos que han completado su desarrollo en el árbol maduran más lentamente debido a la acción de inhibidores presentes en la planta. [3]

3. BIOSÍNTESIS DEL ETILENO EN EL PROCESO DE MADURACION DE LOS FRUTOS

Es un hidrocarburo gaseoso simple que contiene dos átomos de carbono, cuatro de hidrógeno y un doble enlace. [4] Al encontrarse en forma gaseosa en condiciones ambientales, es capaz de difundirse por los espacios intercelulares, llegando a los tejidos de forma uniforme para ejercer sus funciones. [5]

Su síntesis comienza con la formación de S-adenosilmetionina (SAM) a partir de la metionina, catalizada por la enzima S-adenosilmetionina sintasa. La metionina es un aminoácido minoritario en las plantas, pero su suministro está asegurado por medio del ciclo de la metionina o ciclo de Yang. [5]

A continuación, la SAM se convierte en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la acción de la enzima ACC sintasa (ACS) y en una última etapa se produce la oxidación de ACC a etileno por la enzima ACC oxidasa (ACO), estimulado por CO₂. [5]



Se describen dos sistemas de síntesis de etileno en las plantas: [6]

Sistema 1: pequeña producción de etileno que se produce antes del climaterio tanto en frutos climatéricos como en no climatéricos.

Sistema 2: producción masiva de etileno por auto estimulación, denominada síntesis autocatalítica, exclusiva de los frutos climatéricos.

Se conoce bien el mecanismo por el que las plantas reciben y transmiten la señal del etileno. Se ha comprobado que participan proteínas como receptores hormonales (ETR1 y otras de la misma familia), que son similares a las proteínas con actividad histidina quinasa de las bacterias. [7].

A nivel genómico se conoce que los factores de transcripción o ERFs (ethylene-response factor) actúan como factores trans en el último paso de transducción en el núcleo. Son específicos de plantas, formando parte de la extensa superfamilia AP2/ERF, que poseen el dominio de unión al

ADN. [7] La simplicidad aparente del proceso de señalización del etileno no explica la gran diversidad de las respuestas del mismo. Una de las hipótesis que se baraja es que las respuestas diferenciales al etileno son dirigidas en el nivel de factores de transcripción ERF, sugiriendo que estas proteínas son las responsables de ofrecer esa gran diversidad y especificidad que poseen dichas respuestas. [8]

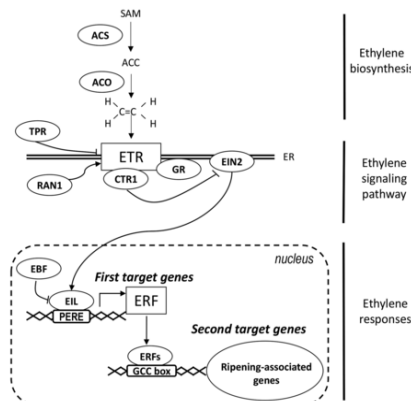


Fig. 2. Esquema simplificado que muestra la síntesis de etileno y de la transcripción en el tomate.

4. APLICACIONES EN LA INDUSTRIA ORTOFRUTICOLA

Los conocimientos del papel del etileno en el proceso de maduración de la fruta y la forma de controlarlo están siendo utilizados por la industria hortofrutícola a fin de mejorar los productos que pone en el mercado, alargar la vida útil de los mismos y su periodo de comercialización. Además, se consigue regular la oferta y la demanda y poner en el mercado productos a precios más estables. [9] Se han venido utilizando la temperatura o el envasado en atmósferas modificadas para limitar la síntesis de etileno, pero en la actualidad se están introduciendo otros sistemas como la incorporación de compuestos retardantes (1-metilciclopropeno (1-MCP), el propileno y el etileno exógeno), la presión parcial reducida de O₂ y la presión parcial mejorada de CO₂, óxido nitroso (inhibe la síntesis de ACS sin efecto tóxico), absorbentes que oxidan el etileno (permanganato de potasio, ozono y algunos absorbentes inertes) [4] y auxinas en fresas para promover en éstas la síntesis de etileno. [3]

Actualmente, se están desarrollando líneas de investigación que sugieren un gran avance en el control de la biosíntesis de etileno y la maduración de la fruta, como por ejemplo el uso de ACO antisentido realizado por manipulación genética, que estimula el consumo de oxígeno e

inhibe el efecto del etileno sobre la respiración [4], así como tecnología basada en ADN recombinante. [6]

Existen ya avanzados estudios en tomates transgénicos, en los que se está realizando la caracterización y clonación molecular de los genes que codifican las enzimas que participan en la síntesis del etileno, a fin de retrasar la maduración para posteriormente iniciarla de forma controlada aplicando etileno exógeno. [3] Estos estudios se están extendiendo a otros frutos importantes desde el punto de vista comercial y económico, tales como la papaya y la uva. [6]

Otras novedosas aplicaciones incluyen la incorporación en el mercado de nuevos envases activos e inteligentes basados en la detección o el control del etileno liberado durante el proceso de maduración de la fruta. Así encontramos envases que utilizan absorbedores de etileno para frenar la acción de este producto durante el envasado de la fruta, o detectores del grado de frescura con absorbedores y sistemas colorimétricos combinados. [10]

5. CONCLUSIONES

Se calcula que las pérdidas post cosecha de fruta pueden rondar alrededor del billón de dólares en el mundo. [6] Esto lleva a la investigación de nuevas formas de prevenir el rápido deterioro de la fruta y alargar su periodo de vida útil. La ingeniería genética promete ser una herramienta útil y eficaz para conseguir controlar el proceso de maduración, así como otros atributos de calidad de la fruta.

Aún queda mucho por conocer sobre las funciones de los componentes individuales de señal del etileno [11] o sobre cómo los factores de transcripción activan o reprimen las rutas específicas de maduración [11] o del papel que tiene el etileno en la maduración de la fruta no climatérica. Estas y muchas más cuestiones quedan por descubrir, abriendo una gran ventana al desarrollo de nuevas investigaciones que terminen de hacernos comprender el proceso de maduración de los frutos y conseguir así un control del proceso de maduración de la fruta eficaz, económico y seguro.

REFERENCIAS

- [1] F. J. G. Breijo, "www.euita.upv.es," [Online]. Available: <http://www.euita.upv.es/varios/bioLOGIA/Temas%20PDF/Tema%2014d%20Reguladores%20del%20Crecimiento.%20Etileno.pdf>. [Accessed 3 Mayo 2014].

- [2] L. Taiz and E. Zeiger, "Cap. 22 Etileno: La Hormona Gaseosa," in *Fisiología Vegetal*, 2007, pp. 991-1028.
- [3] J. Azcón-Bieto and M. Talón, "Capítulo 26 Crecimiento y maduración del fruto.," in *Fundamentos de fisiología vegetal*, Barcelona, McGraw-Hill - Interamericana de España S. L., 2008, pp. 518-535.
- [4] E. C. Iguarán and O. T. Alzate, "Hallazgos de la Biosíntesis del Etileno en frutas climatéricas y de los factores que afectan a la ruta metabólica.," *Revista Alimentos Hoy*, vol. 22, no. 31, pp. 46-63, 2014.
- [5] J. Azcon-Bieto and M. Talón, "Capítulo 22 Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo," in *Fundamentos de fisiología vegetal 2ª Ed.*, Barcelona, McGraw-Hill - Interamericana de España S. L., 2008, pp. 445-465.
- [6] V. A. Bapat, P. K. Trivedi, A. Ghosh, V. A. Sane, T. R. Ganapathi and P. Nath, "Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene," *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 1, pp. 94-107, 2010.
- [7] A. Wang, D. Tan, A. Takahashi, T. Z. Li and T. Harada, "MdERFs, two ethylene-response factors involved in apple fruit ripening.," *Journal of Experimental Botany*, vol. 58, no. 13, p. 3743-3748, 2007.
- [8] M. Liu, J. Pirrello, C. Chervin, J.-P. Roustan and M. Bouzayen, "Ethylene Control of Fruit Ripening: Revisiting the Complex Network of Transcriptional Regulation," *Plant Physiology*, vol. 169, no. 4, pp. 2380-2390, 2015.
- [9] M. Jordán and J. Casaretto, "Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico.," in *Fisiología vegetal.*, La Serena, Chile, Ediciones Universidad de La Serena, 2006.
- [10] P. Suppakul, "Active and Intelligent Packaging.," in *Polimers for Packaging Applications*, Apple Academic Press Inc, 2015, pp. 393-420.
- [11] C. S. Barry and J. J. Giovannoni, "Ethylene and Fruit Ripening," *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 26, no. June, pp. 143-159, 2007.



Marina Domínguez Quintero matriculada en el 1^{er} curso del grado de Biotecnología, opción bilingüe, en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Gaucher Disease and the Future of Medicine

Ana Batanero Domínguez

Abstract — Lysosomal storage diseases (LSD) are a group of inherited metabolic disorders caused by a mutation in the genes that encode lysosomal enzymes resulting in an interruption in the endoplasmic reticulum (ER) to lysosomes traffic. Subsequent accumulation of metabolites intermediated can lead to a range of potentially life-threatening pathologies. The most prevalent LSD is Gaucher disease (GD) characterized by the defective activity of the enzyme β -glucocerebrosidase and glucosylceramide accumulation. In recent years, a new therapeutic treatment for GD has been analysed called chemical chaperone therapy. It is a promising method focusing on a small molecule that can selectively bind to a target protein in the ER and stabilize the correct three-dimensional conformation allowing ER-lysosome traffic. Many new chaperones have recently been studied that have been classified depending on their chemical nature and, at present, the side-effects of the therapy as well as different possible applications are being investigated.

Key Words— Enzyme, Chaperone, Treatment, Lysosomal Storage Disease.

1. INTRODUCTION

Lysosomal storage diseases (LSDs) are a clinically heterogeneous group of more than 40 metabolic disorders primarily present in degenerative diseases [1]. They are caused by inherited recessive mutations in the genes that encode lysosomal enzymes that make the latter unable to pass the quality control mechanisms of the endoplasmic reticulum (ER). As a consequence, the enzymes are unable to fold in the same way as the stable wild type. This causes a reduction of the ER-lysosome traffic which involves the disruption of many enzymatic processes that can result in the accumulation of one or more metabolic intermediates, in many cases leading to a pathological disease. The pathologies associated with substrate accumulation involve a wide range of phenotypes, which vary depending on specific storage material, where the material accumulates, as well as the degree to which enzyme activity is compromised. The main purpose of this article is to focus on Gaucher disease (GD), the most prevalent lysosomal storage disorder [2].

2. GAUCHER DISEASE

GD is the most prevalent lysosomal storage disorder classified as a rare disease. Its prevalence is estimated to be 1/57000 live births [1]. It is an inherited metabolic disorder caused by mutations in the glucocerebrosidase gene (GBA1), also known as acid β -glucosidase, which involves a defective and insufficient activity of the enzyme β -glucocerebrosidase (GCase) that carries out the hydrolysis of the β -glycopyranosyl linkage in glucosylceramide (GlcCer). This mutation results in a progressive accumulation of glucosylceramide in lysosomes, particularly in white blood cells and especially in macrophages

of the liver, bone marrow, and spleen [1], [3]. The accumulation has important consequences not only in this organelles but also in mitochondrias, or the ER. Patients with GD share a common phenotype in the majority of cases based on hematological manifestations such as anemia and thrombocytopenia, as well as hepatosplenomegaly, skeletal deformities, and in some cases neurological impairment. Lysosomal enzymes can be divided into four basic categories and our focus will be that which involves the metabolic pathway for the synthesis and degradation of glycolipids focusing on Asialogangliosides, which is related to GD [2] (Figure 1).

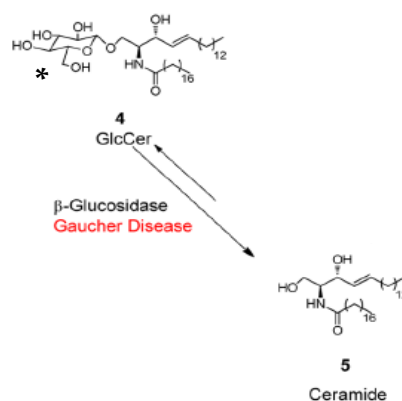


Figure 1. Part of the metabolic pathway for the synthesis and degradation of asialogangliosides. Some mutations of the enzyme cause GlcCer to accumulate (* Designates location) [2].

3. ITS ORIGINS

Many of the mutations related to GD do not impair the catalytic activity of GCCase directly, but cause the synthesis of proteins that are functionally able to do so. As they do not fold as stably as the wild-type, mistaken traffic to their intended cellular location ensues [2], [4]. The majority of patients that suffer from GD have one allele with either the N370S or the L444P mutation. The N370S mutant is associated with type I GD, the only one with no obvious neuropathic symptoms, and is related to the catalytic domain. The enzyme has 30% of the enzymatic activity of the wild-type and the substrate mainly accumulates in liver and spleen, with a common phenotype of hepatosplenomegaly. In contrast, the L444P mutant has less residual activity and is related with type II GD, called “the infantile-onset acute neuropathic form”, which carries a very severe diagnosis. This mutation is not related to the catalytic domain, which implies being refractory to most pharmacological chaperone options. Patient homozygous for the L444P mutation often present the CNS (Central Nervous System) malfunction that is associated with type III GD, which involves a chronic neuropathic form called “subacute neuropathy” [1], [4].

4. CURRENT TREATMENTS: CHAPERONES

To avoid the limitations of prior treatments such as enzyme replacement therapy (ERT) and substrate reduction therapy (SRT) involving neurological manifestations, new therapeutic treatments for GD have been explored in recent years. Chemical chaperone therapy is a promising method because of its potential for easy oral administration, penetration of the blood-brain barrier (BBB), and low cost. Pharmacological chaperones (PCs) are mainly active-site-directed chemicals (acting as competitive inhibitors) that bind to a target protein in the ER and stabilize the correct three-dimensional conformation allowing the properly folded enzyme to cross the quality control mechanisms of the ER and to be translocated into lysosomes. Given that PCs bind to the catalytic site, subsequent dissociation is required to allow for substrate turnover and this is favored by moderate binding affinity of the PCs at lysosomal pH or an excess of substrate. Through this mechanism, PCs manage to increase the residual enzyme activity of the cells [1], [2], [3].

4.1. Biodistribution and side-effects

PCs are designed specifically for each enzyme based on the substrate structure or identified through high-throughput screening (HTS) using inhibition and/or thermal stability assays that cannot interfere with im-

portant protein-protein interactions of a functional enzyme [2]. For this reason, unfavorable biodistribution and potential side-effects remain important issues. Presently, a new strategy has been designed to enhance the controlled delivery of PCs to macrophages that focuses on the formation of ternary complexes between the PC, a trivalent mannosylated β -cyclodextrin (β CD) conjugate and the macrophage mannose receptor. It is favored by the basket-shaped structure of CDs features a hydrophobic cavity that can accommodate guest molecules of appropriate size and improve their water solubility and bio-availability [4]. To ensure that this process is properly carried out in specific families of chaperones, such as bicyclic nojirimycin (NJ) derivatives of the sp²-iminosugar type (discussed later), and obtain information about the cellular uptake pathway and intracellular distribution, a fluorescent analogue has been synthesized that does not involve modification of the biological activity [3]. Despite all these challenges, many promising results, later discussed, have been reported [2].

4.2. Chaperone Classification

GCCase PCs can be classified as carbohydrate mimetic (iminosugars, azasugars and carbasugars) or non-carbohydrate compounds. First of all, we will focus on the main types of carbohydrate mimetic. The investigation of the chemical chaperone therapy was initiated focusing on unmodified iminosugars that behave as competitive inhibitors of GCCase. Among those, that which showed the most promising results was isofagomine (IFG). Chaperones based on IFG, bind to GCCase with the nitrogen atom occupying a portion analogous to the anomeric carbon of glucose in GCCase-bound GlcCer. Based on the discovery of N-butyl and N-nonyl DNJ (deoxynojirimycin)(NB-DNJ and NN-DNJ), iminosugars with N-linked alkyl chains, a large number of iminosugars analogues have been synthesized and evaluated. These have a high efficiency in mediating the formation of the enzyme-substrate complex through a mechanism based on the orientation of the alkyl chains (N-substituent) of the chaperones, as they are oriented towards the entrance of the active site in the corresponding chaperone-GCCase complexes, increasing favorable hydrophobic contacts with amino acid residues that result in the stability of the complex. Derivatives of these chaperones are those called N-substituted δ -lactams with a carbonyl group instead of the hydroxymethyl group in a deoxynojirimycin (DNJ) scaffold. Other promising modifications included the introduction of a 1,2,3-triazole group. Although N-alkylated iminosugars generally increase GCCase activity, this does not happen when N-alkylation of iminosugars 1-azasugars is undertaken,

which leads to little or no effect on the enzymatic activity. Investigations show that if the alkyl substituent is moved from the N-atom to the adjacent C-atom, the chaperon activity is restored. Afterwards, a collection of sixteen 1-C-alkylated DIX (1,5-dideoxy-1,5-iminoxylitol) is generated whose derivatives bear various lipophilic substituents. The latest news reveal that the collection has been increased by using the alkynyl DIX precursor **30** and applying CuAAC ligation chemistry. Replacement of the amine group of iminosugars, which is not really effective, into a trigonal planar pseudoamide-type nitrogen (N-carbonyl, N-thiocarbonyl, N-imino group), with substantial sp²-hybridization, drastically modifies its chemical and stereoelectronic properties by amplifying the range of substituents. Specifically, amphiphilic bicyclic sp²-iminosugars related to the natural reducing alkaloid nojirimycin (NJ), such as 5N,6O-(N'-octyliminomethylidene)nojirimycin (**39**, NOI-NJ) or its 6-thio (**40**, 6SNOI-NJ) and 6-amino-6-deoxy (**41**, 6N-NOI-NJ) analogues are anomeric-specific inhibitors of GCase. It is carried out by the axial orientation of the pseudoanomeric OH group in the ground state of the glycomimetics in aqueous solution switch to equatorial (β -configuration) when complexed with the enzyme, with the octyl chain locating at the hydrophobic pocket at the entrance of the catalytic site. Other important chaperone types are aminocyclitols and aminosugars. On the other hand, non-carbohydrate chaperones appear to be equally promising than the carbohydrate-based ones. However, it hasn't been completely proved if they are able to increase the turnover of a glucosylceramide-like substrate. Consequently, investigations on this type of chaperones now focus on fully understanding its mechanism. Within this group, ambroxol, quinazolines and pyrazolopyrimidine are worth highlighting [1], [2], [5], [6], [7], [8].

5. CURRENT INVESTIGATIONS WITH CHAPERONES

Recent investigations show the correlation between the homozygous L444P mutation and its harmful effects in mitochondria, whose dysfunction is associated with reduced mitochondrial membrane potential, increased reactive oxygen species (ROS), mitophagy activation and impaired autophagic flux (in some cases, mitochondria elimination). These dysfunctions have been treated with a newfangled therapy based on the combination of coenzyme Q10 (antioxidant and mitochondrial energizer) and the chemical chaperone treatment, specifically, the chaperone is N-[N'-(4-adamantan-1-ylcarboxamidobutyl)thiocarbamoyl]-1, 6-anhydro-L idonojirimycin (NAdBT-AIJ). This fact suggests that the treatment can be used as a

therapy in neurological forms of GD [5]. Additionally, the latest investigations about Parkinson's disease (PD) have glimpsed into its relationship with GD. It has been observed that GBA1 mutation increases the risk of developing PD 20-30 fold and, moreover, around 10% of GD patients show the mutation. Despite the important advances in the GD research, the mechanism by which GBA1 mutations increase the risk for PD is still unknown. It is believed that the harmful effects of GlcCer accumulation in ER leads to an increase in the ubiquitin-proteasome system (UPS) and ER stress which triggers the unfolded protein response (UPR) and/or endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). The prolonged activation of UPR and ERAD subsequently leads to increased apoptosis, and also, leads to a retardation of alpha-synuclein degradation via chaperone-mediated autophagy (CMA), which results in alpha-synuclein accumulation and aggregation. All these facts contribute to the development of PD-GBA1. Also, chaperones are being studied for their use in combinatory therapies such as those that involve the stabilization of recombined enzymes used in ERT [9].

6. CONCLUSIONS

Investigators have managed to discover a promising method based on an easy oral administration, penetration of the BBB and, surprisingly, at a low cost. It brings about a relief for those patients that suffer from a commonly called "weird illness". The use of the chemical chaperone therapy to treat inherited metabolic disorders such as LSDs opens the door to the investigation of many different illnesses. In our society, it can be regarded as an even more desirable medical approach considering the limited amount of financial investment committed to investigation in our country. The significance of this treatment is increased by discoveries with unexpected consequences made during the investigation process and the fact that specific chaperones are capable of crossing the BBB, allowing their use for the investigation of other illnesses with neuropathic forms. In addition, many illnesses such as the Marfan syndrome are caused by mutated enzymes, so the possibility of applying enzyme-directed chaperones could lead to the next big strategy in the treatment of these diseases. After having read about the research process that has explored several classes of chaperones, and taking into account that non-carbohydrate chaperones have not been fully understood yet, the therapeutic applications of chemical chaperones is expected to increase strongly over the next few years. Also the examples of chaperones described in the article shows how complex the mechanism is, but also the variety of possible treat-

ments that these open up, as highlighted by those mechanisms already discovered in Fabry, Pompe or Krabbe disease. In summary, the discovery of chaperones has contributed to the medical world in a very significant way. We could very likely be dealing with one of the facets of the future of medicine.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Dr. Luis M. Jiménez for providing her an entry in the world of medical biotechnology and also thank Dr. Carmen Ortiz Mellet for conveying her knowledge and helping me discover this huge undiscovered world. And finally, to Jeff Trench, for his patience.

REFERENCES

- [1] E. M. Sánchez-Fernández, J. M. García Fernández, and C. O. Mellet, "Glycomimetic-based pharmacological chaperones for lysosomal storage disorders: lessons from Gaucher, GM1-gangliosidosis and Fabry diseases.," *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 52, no. 32, pp. 5497–515, Apr. 2016.
- [2] R. E. Boyd, G. Lee, P. Rybczynski, E. R. Benjamin, R. Khanna, B. A. Wustman, and K. J. Valenzano, "Pharmacological chaperones as therapeutics for lysosomal storage diseases.," *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 7, pp. 2705–25, Apr. 2013.
- [3] Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, L. Li, H. Ninomiya, E. Nanba, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, and Y. Suzuki, "A Fluorescent sp2-iminosugar with pharmacological chaperone activity for gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies.," *Chembiochem*, vol. 11, no. 17, pp. 2453–64, Nov. 2010.
- [4] J. Rodríguez-Lavado, M. de la Mata, J. L. Jiménez-Blanco, M. I. García-Moreno, J. M. Benito, A. Díaz-Quintana, J. A. Sánchez-Alcázar, K. Higaki, E. Nanba, K. Ohno, Y. Suzuki, C. Ortiz Mellet, and J. M. García Fernández, "Targeted delivery of pharmacological chaperones for Gaucher disease to macrophages by a mannosylated cyclodextrin carrier.," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 12, no. 14, pp. 2289–301, Apr. 2014.
- [5] M. de la Mata, D. Cotán, M. Oropesa-Ávila, J. Garrido-Maraver, M. D. Cordero, M. Villanueva Paz, A. Delgado Pavón, E. Alcocer-Gómez, I. de Laverá, P. Ybot-González, A. Paula Zaderenko, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, and J. A. Sánchez-Alcázar, "Pharmacological Chaperones and Coenzyme Q10 Treatment Improves Mutant β -Glucocerebrosidase Activity and Mitochondrial Function in Neuronopathic Forms of Gaucher Disease.," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 10903, Jan. 2015.
- [6] "OMIM Entry - # 231000 - GAUCHER DISEASE, TYPE III." [Online]. Available: <http://www.omim.org/entry/231000?search=gaucher&highlight=gaucher>.
- [7] E. Laigre, D. Hazelard, J. Casas, J. Serra-Vinardell, H. Michelakakis, I. Mavridou, J. F. G. Aerts, A. Delgado, and P. Compain, "Investigation of original multivalent iminosugars as pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher disease.," *Carbohydr. Res.*, Mar. 2016.
- [8] E. Laigre, D. Hazelard, J. Casas, J. Serra-Vinardell, H. Michelakakis, I. Mavridou, J. F. G. Aerts, A. Delgado, and P. Compain, "Investigation of original multivalent iminosugars as pharmacological chaperones for the treatment of Gaucher disease.," *Carbohydr. Res.*, Mar. 2016.
- [9] A. Migdalska-Richards and A. H. V Schapira, "The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease.," *J. Neurochem.*, Feb. 2016.



Ana Batanero Domínguez, student of 1st year of Biotechnology at the Universidad Pablo de Olavide (Seville). Intern in the department of Anatomy, Physiology and Cellular Biology at Pablo de Olavide University.

La teixobactina y el iChip: nuevas armas contra la resistencia antibiótica

Juan Morillas Viñuales

Resumen—El surgimiento y la proliferación de cepas de microorganismos patógenos multiresistentes suponen una amenaza de primer orden para la salud pública a escala mundial. Es necesario buscar nuevos antibióticos contra los que nuestros microorganismos patógenos no hayan desarrollado resistencias. La teixobactina es una novedosa sustancia que no solo muestra una prometedora actividad antibiótica y una peculiar resistencia a ser resistida, sino que además trae consigo un cambio de paradigma en la forma de descubrir nuevos antibióticos.

Palabras Claves— Antibióticos, Resistencia antibiótica, técnicas de cultivo, Microbiología, Síntesis orgánica

1. LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

Desde la introducción de la penicilina a mediados del siglo XX en la práctica médica habitual, los antibióticos han sido uno de los pilares sobre los que se sustenta la medicina occidental moderna. Gracias a este diverso grupo de sustancias, que tienen en común su capacidad para matar o detener el crecimiento de microorganismos celulares, nuestra esperanza de vida ha aumentado considerablemente durante este último siglo [1].

Durante las décadas de 1950 y 1960 se buscaron antibióticos que, como la penicilina, tuvieran su origen en la naturaleza: sustancias producidas por microorganismos, generalmente hongos, para defenderse de otros. Este enfoque dio muy buenos resultados, y dio lugar a lo que se conoce como la Edad de Oro de los antibióticos, durante la que se descubrieron gran parte de los antibióticos que aún hoy usamos. En los años 80 esta fuente pareció agotarse, y surgió un enfoque diferente. Se buscaron compuestos sintéticos que presentaran actividad antibiótica, aunque con resultados pobres [1]. Agotadas ambas vías, no parecía haber nuevos caminos que tomar en busca de nuevos antibióticos.

De manera paralela a la generalización del uso de antibióticos en la clínica, se fue detectando la aparición de cepas de bacterias que presentaban resistencias a la acción de los antibióticos [2]. Los mecanismos por los que estos microorganismos desarrollaron resistencias son muy diversos y variados: ciertas especies desarrollaron unas bombas proteicas con las que expulsan de manera activa el antibiótico de su citoplasma; otras comenzaron a producir β -lactamasas, enzimas que digieren los antibióticos de la familia de los β -lactámicos, de la que es miembro la penicilina, etc. Estas adaptaciones surgieron de manera espontánea como mutaciones en el material genético bacteriano, y fueron seleccionadas positivamente al permitir sobrevivir a la acción de los antibióticos, lo que permitió la rápida proliferación de las resistencias. El uso irrespon-

sable de los antibióticos por parte de pacientes que se automedican, profesionales clínicos que recurren a ellos sin necesidad de hacerlo o la industria ganadera han acelerado este proceso en los últimos años [2].

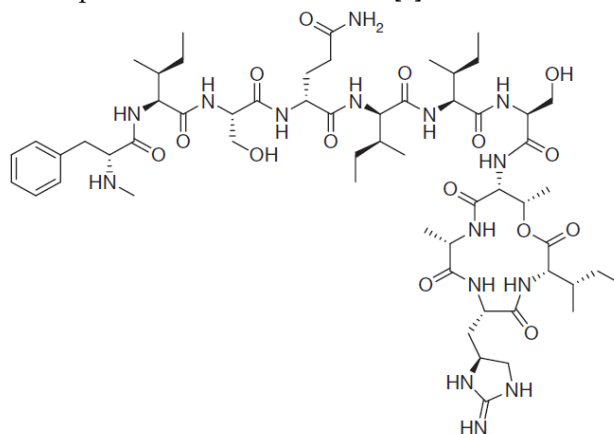


Fig. 1: Estructura de la teixobactina [3]

Además, en esta carrera armamentística las bacterias cuentan con un as bajo la manga más: a través de procesos de transferencia horizontal de genes, como la transformación o la conjugación, bacterias que no están directamente relacionadas o que pertenecen a especies diferentes pueden intercambiar material genético [2]. Esto ha permitido que se desarrollen cepas que presentan mecanismos de resistencia contra múltiples antibióticos a la vez: son las cepas multiresistentes, o “superbacterias”, como se las llama coloquialmente. Suelen surgir en entornos donde la presión selectiva es especialmente fuerte, como en hospitales. Son la causa de las infecciones nosocomiales (aquellas que se dan en entornos hospitalarios) intratables, duraderas y virulentas que cada vez son más frecuentes y responsables de cada vez más muertes [2]. Se han llegado a detectar bacterias resistentes a todo nuestro arsenal antibacteriano [2].

Estas cepas multiresistentes constituyen a día de hoy una seria amenaza contra la salud pública del mundo entero

[2]. Sin herramientas nuevas con las que hacerles frente, encontrar nuevos antibióticos (u otras maneras creativas de combatir la resistencia) se ha convertido en una prioridad para las autoridades en salud pública de todo el planeta. Sin embargo, la baja rentabilidad de las investigaciones sobre este tipo de fármacos y las dificultades antes expuestas para encontrar un punto de partida desde el que buscar nuevas y prometedoras sustancias parecen ser dos obstáculos difíciles de salvar [1].

2. EL iCHIP Y LA TEIXOBACTINA

Con la reciente llegada de la era genómica, el análisis del metagenoma (el conjunto de todos los genomas de los microorganismos que pueblan un entorno) del suelo reveló que el 99% de los microorganismos que viven allí no son cultivables en los medios habituales de laboratorio [3]. Solo pueden crecer en su medio natural, donde existen los factores de crecimiento y las condiciones adecuadas para su proliferación. Con la intención de poder cultivar y conocer mejor esta "materia oscura" microbiana se desarrolló el iChip, un dispositivo de plástico atravesado por una serie de diminutos poros [4]. Estos poros se llenan de agar fundido y mezclado con una dilución de material del suelo, que permite que en ese poro crezca únicamente una bacteria (Fig.2). El iChip se introduce de nuevo en el suelo y se deja incubar, de manera que los microorganismos del suelo son "engañados", recibiendo los factores de crecimiento de su medio natural y creciendo en el iChip [4].

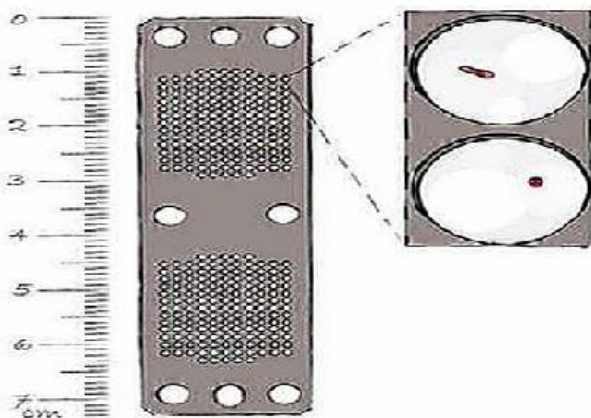


Fig. 2: Esquema del iChip [3].

Esta nueva técnica de cultivo ha resucitado la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos en la naturaleza. Con la esperanza de encontrar antibióticos nunca antes caracterizados se empleó el iChip para identificar y aislar nuevas especies de bacterias del suelo, y evaluar si alguna de ellas presentaba actividad antibiótica. Se encontró una muy prometedora bacteria gramnegativa: *Eleftheria terrae*. Esta especie produce de manera natural una sustancia llamada teixobactina que presenta una muy potente acti-

vidad antibacteriana [3].

La teixobactina es un depsipéptido (un péptido en el que al menos uno de los enlaces amida es sustituido por un éster) corto, compuesto por una serie de aminoácidos poco frecuentes y no proteínogénicos: N-metilfenilalanina, enduracididina, y otros D-aminoácidos (Fig.1). Su ruta biosintética consta de dos genes: *txo1* y *txo2*. Presenta una acción antibiótica muy potente, incluso a bajas concentraciones, contra bacterias grampositivas. No sucede así con gramnegativas. Esta diferente eficacia se debe al mecanismo de acción de la teixobactina [3].

La teixobactina actúa uniéndose a precursores lipídicos de la pared bacteriana, en concreto al undecaprenil pirofosfato y a los lípidos I y II, impidiendo que formen peptidoglicano, un componente mayoritario de la pared de grampositivas. En gramnegativas el peptidoglicano es un componente de menor importancia, lo que unido a la presencia de una membrana externa de permeabilidad selectiva que rodea a la exigua capa de peptidoglicano, explica la escasa eficacia de la teixobactina en este tipo de bacterias. [1][3]

Aún no ha finalizado ningún estudio clínico en humanos, pero la teixobactina se ha probado en modelos murinos de septicemia con muy buenos resultados: ratones infectados con MRSA (*S. aureus* resistente a la meticilina, una de las "superbacterias" más estudiadas) sobrevivieron a la infección con una dosis mucho menor a la que se necesita de vancomicina (el antibiótico usado normalmente contra MRSA) para conseguir el mismo efecto, y con muy poca toxicidad [3].

Las cepas bacterianas sensibles a la teixobactina, además, no han dado señales de estar desarrollando ningún tipo de resistencia [3]. Esto se debe a que la diana de la teixobactina es un lípido, un elemento estructural básico y vital para la célula, altamente conservado en la evolución, cuyo metabolismo involucra a varios genes. Modificar la estructura de los lípidos para hacerlos "invisibles" a la teixobactina requeriría que surgieran espontáneamente mutaciones en más de un gen de la misma ruta metabólica, lo cual, por improbable, puede llevar un tiempo considerable. Sin embargo esto no es garantía de que no surjan nunca cepas resistentes. Se detectaron cepas resistentes a la vancomicina, un antibiótico con un mecanismo de acción similar a la teixobactina, 30 años después de su introducción a la clínica [4].

3. SÍNTESIS QUÍMICA Y ANÁLOGOS

El siguiente paso hacia la introducción de la teixobactina en la práctica médica cotidiana es su producción a gran escala. En su síntesis en laboratorio se presenta una dificultad: uno de los aminoácidos que constituyen el polipéptido, la enduracididina, es muy inusual y no está disponible comercialmente [6]. Esto encarece y dificulta enormemente la síntesis de la teixobactina. Por ello, en los primeros abordajes al problema se ha optado por sinteti-

zar un análogo de la teixobactina, en el que se sustituye la enduracididina por la más frecuente arginina, puesto que ambos presentan un grupo guanidino, aunque este es lineal en el caso de la arginina y cíclico en el caso de la enduracididina (Fig.3) [5], [6]. La síntesis se desarrolla en un medio sólido, la resina Wang, usada con frecuencia para la síntesis de péptidos [6].

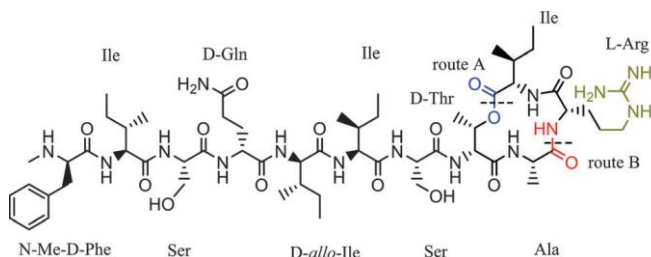


Fig. 3: Análogo obtenido. En verde el resto de arginina [6].

El procedimiento tiene un rendimiento del 22%, y requiere un único paso de purificación. Los análogos obtenidos presentan un comportamiento semejante solo si mantienen la quiralidad de sus centros estereogénicos, lo que demuestra que la estereoquímica de la teixobactina es vital para su actividad. [6]

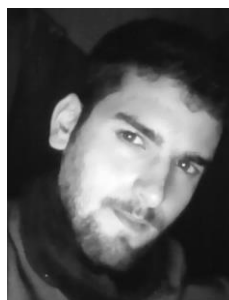
5. CONCLUSIONES

Si bien aún no se ha trasladado a la clínica, las cualidades tanto *in vitro* como *in vivo* de la teixobactina resultan muy prometedoras como antibiótico, lo cual supone un rayo de esperanza en el lúgubre panorama que pintan las bacterias multirresistentes. Gracias a la química sintética, y como resultado de un esfuerzo multidisciplinar, se pueden obtener derivados de la teixobactina que amplíen el arsenal antibacteriano disponible para hacer frente a los futuros retos de la salud pública mundial.

Sin embargo, lo más relevante del descubrimiento de la teixobactina no es, probablemente, la sustancia en sí, sino el nuevo paradigma que el iChip trae al mundo de la búsqueda de productos naturales de interés. Supone un retorno a la naturaleza, una mirada más concienzuda a la diversidad biológica que nos rodea. Quizá gracias al iChip se encuentren no solo nuevos antibióticos, (puede que alguno efectivo contra bacterias gramnegativas) sino nuevas sustancias que se empleen como antitumorales, o nuevas especies de microorganismos que nos obliguen a reescribir la historia de la evolución. El iChip es, verdaderamente, una herramienta con mucho potencial.

REFERENCIAS

- [1] G. Wright, "An irresistible newcomer," *Nature*, vol. 517, no. 7535, pp. 442–443, 2015.
- [2] G. Report, "Antimicrobial resistance," *Bull. World Health Organ.*, vol. 61, no. 3, pp. 383–94, 2014.
- [3] L. L. Ling, T. Schneider, A. J. Peoples, A. L. Spoering, I. Engels, B. P. Conlon, A. Mueller, D. E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides, V. a Steadman, D. R. Cohen, C. R. Felix, K. A. Fetterman, W. P. Millett, A. G. Nitti, A. M. Zullo, C. Chen, and K. Lewis, "A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance," *Nature*, vol. 517, no. 7535, pp. 455–459, 2015.
- [4] R. T. Sherpa, C. J. Reese, and H. M. Aliabadi, "Application of iChip to grow uncultivable microorganisms and its impact on antibiotic discovery," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 18, no. 3, pp. 303–315, 2015.
- [5] Y. E. Jad, G. A. Acosta, T. Naicker, M. Ramtahal, A. El-Faham, T. Govender, H. G. Kruger, B. G. De La Torre, and F. Albericio, "Synthesis and Biological Evaluation of a Teixobactin Analogue," *Org. Lett.*, vol. 17, no. 24, pp. 6182–6185, 2015.
- [6] A. Parmar, A. Iyer, C. S. Vincent, D. Van Lysebetten, S. H. Prior, A. Madder, E. J. Taylor, and I. Singh, "Efficient total syntheses and biological activities of two teixobactin analogues," *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 36, pp. 6060–6063, 2016.



Juan Morillas Viñuales estudia primero de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide. Le interesa la divulgación científica, y es un apasionado de la ciencia y la tecnología.

La nanotecnología al servicio de los documentos

Carmen Estrela Monreal

Resumen—La nanotecnología está jugando un papel decisivo en la conservación del Patrimonio, y en concreto en la conservación de documentos. Gracias a las ventajas que adquieren los compuestos sintetizados en escala nanométrica, podemos mejorar los tratamientos sobre documentos en papel, consiguiendo así detener su deterioro.

Palabras Claves— Papel, nanopartículas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, desacidificación, conservación, documentos, Patrimonio.

1. INTRODUCCIÓN

Desde su invención, el papel es uno de los más importantes transmisores de información histórica, cultural, científica y económica. En él se convierten las ideas, intangibles, en algo que perdura en el espacio y en el tiempo. Dada su gran importancia, su preservación es de gran interés.

Agentes físicos, químicos y biológicos pueden deteriorarlo. Entre ellos, el envejecimiento de la celulosa, principal componente del papel, y la acidificación consecuente, es uno de los principales factores que inciden en su deterioro, debilitándolo y provocando amarilleamiento y falta de resistencia [1]. Por ello, eliminar y prevenir la acidez es un proceso fundamental de conservación y restauración de documentos, ampliamente estudiado y con gran diversidad de métodos, así como los procesos tendentes a evitar el deterioro producido por hongos y otros microorganismos.

La aplicación de la nanotecnología y la utilización de nanopartículas en los procesos de conservación y restauración de documentos de papel está dando muy buenos resultados, por las ventajas que adquieren los compuestos sintetizados en escala nanométrica.

En este artículo se expondrán algunas de las principales nanopartículas que se están evaluando en la actualidad sobre documentos en papel.

2. EL PAPEL Y SU DETERIORO

El principal componente de las fibras de papel es la celulosa, un polímero en forma de cadena, compuesto de monómeros de β -glucosa que se repiten y que están unidos entre sí a través de los átomos de oxígeno que se encuentran enlazados a los átomos de carbono 1 y 4. Esta unión es llamada enlace beta-1,4-glucosídico [2].

La estabilidad química del papel es proporcional al grado de polimerización (PD) de las moléculas de celulosa que la componen, es decir, cuando mayor es el PD, la molécula de celulosa es más larga y más estable desde el

punto de vista químico. Sin embargo, la degradación química del papel es un hecho inevitable y que se produce de forma natural por dos mecanismos ampliamente aceptados: la escisión de la cadena polimérica por la ruptura del enlace beta-1,4-glucosídico antes mencionado (Ver Fig.1) y por la degradación de los monómeros mediante transformación oxidativa de los grupos hidroxilos de los carbonos 2,3 y 6 [2], [3].

Estos cambios naturales pueden verse acelerados por factores como la presencia de alumbre utilizado en el proceso de fabricación, la presencia de lignina en su composición, la acidez del ambiente, las tensiones mecánicas, la conservación en ambientes con elevadas temperaturas y humedad relativa, la exposición a radiaciones UV y el contacto con las tintas metalogálicas [4]. Todos estos factores pueden acelerar la disminución del PD, lo que supone la ruptura de cadenas, haciéndolas más cortas, disminuyendo así su resistencia y en consecuencia produciendo debilitamiento y friabilidad en el papel. La vida del papel en estas condiciones se acortará, y con ello, gran parte de la información se perderá.

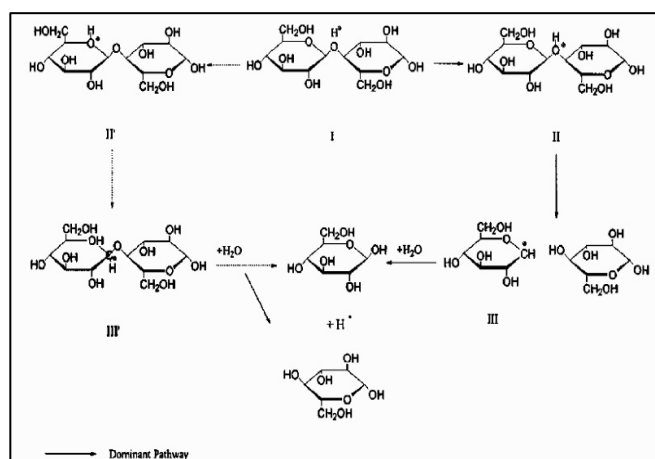


Fig. 1. Mecanismo de la hidrólisis ácida de la celulosa

Fuente: <http://www.responsiblebusiness.eu/display/rebwp7/1Hydrolysis+of+lignocellulosic+biomass>

3. LA NANOTECNOLOGÍA Y LOS NANOMATERIALES

Los nanomateriales se caracterizan por poseer al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica, siendo un nanómetro la millonésima parte del milímetro [5]. Estas nanopartículas modifican o mejoran sus propiedades por efecto de la reducción de su tamaño; su mayor superficie específica o fracción de material que queda expuesta al exterior tiene como consecuencia un aumento de su reactividad [5], [6] y de la solubilidad [6]. Esto permite obtener propiedades y características únicas y diferentes al material de partida correspondiente en sólidos (bulk) o moléculas.

La nanotecnología representa la herramienta de progreso fundamental para muchos campos de investigación, incluida la restauración y conservación de documentos. Son muchas las investigaciones que se están llevando a cabo con esta tecnología para preservar este bien tan preciado como son los documentos u objetos de arte sobre papel.

A continuación se expondrán algunos de los resultados obtenidos con nanopartículas que han sido utilizadas para intentar atajar algunos de los problemas más importantes que causan su deterioro: la acidez y el ataque de microorganismos.

4. APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGÍA A LA CONSERVACIÓN DEL PAPEL

4.1. Nanopartículas para tratamientos de desacidificación

La hidrólisis ácida de la celulosa es uno de los principales mecanismos de deterioro químico del papel, y la acidez es tanto causa como síntoma fiable de ese deterioro.

Los tratamientos de desacidificación de documentos tienen como objetivos la neutralización de los productos ácidos presentes en el papel y la introducción de un elemento alcalino entre las fibras, a modo de reserva, que neutralice los ácidos en un futuro y por ende, su deterioro.

Una de las propuestas para la desacidificación no acuosa es la basada en tratamientos por inmersión en suspensiones de nanopartículas de hidróxido de calcio, en alcohol isopropílico [1], [2], [4], [7], o en gelatina hidroalcohólica [8].

Las investigaciones demuestran una mayor homogeneización en la distribución del compuesto por la superficie del papel, mediante su evaluación post tratamiento con microscopía electrónica (SEM/EDX) [8], acompañado con un incremento del pH (entre 3 y 4 unidades) que permanece estable por periodos prolongados bajo envejecimiento natural [4], [8]. También muestra resultados satisfactorios en cuanto al PD, si se compara con muestras no tratadas con estos compuestos [8].

Otra de las ventajas en la utilización de este tipo de partículas nanométricas es el mantenimiento de la coloración de las tintas ferrogálicas, al contrario de lo que ocu-

rre con tratamientos de desacidificación tradicionales acuosos, donde la apariencia de la tinta cambia considerablemente [1].

Por tanto, el tratamiento con nanopartículas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ puede ser una alternativa para los papeles que no pueden ser tratados con agua, debido a la presencia de componentes solubles en éste [1].

Similares resultados se han obtenido con nanopartículas de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ [7], [9], estableciendo comparaciones con el producto Bookkeeper®, elaborado con micropartículas de óxido de Magnesio. Éste producto comercial presenta aspectos positivos en comparación con los métodos acuosos de desacidificación tradicionales. No obstante, la utilización de nanopartículas presenta algunas ventajas con respecto al producto Bookeeper® ya que su escasa penetración en papeles satinados o con recubrimientos produce depósitos de polvo en la superficie del papel [7], aspecto éste que no ocurre con las nanopartículas, que dado su tamaño, penetran de forma homogénea por toda la superficie.

Por último destacamos la facilidad de aplicación de las suspensiones de nanopartículas, ya que se pueden aplicar por pulverización, con pincel y por inmersión. Su uso no requiere de costoso instrumental ni de un procedimiento especial de seguridad [4], [7]. Además es cuidadoso con el medioambiente y es más barato que los métodos tradicionales de desacidificación de papel [7].

4.2. Nanopartículas empleadas en otros tratamientos

El papel también puede ser objeto de degradación causada por diferentes microorganismos. Entre ellos, los hongos son uno de los mayores agentes de su biodeterioro [10], [11].

El exceso de humedad, la alta temperatura y un medioambiente contaminado son factores que generalmente pueden activar el crecimiento de hongos y microorganismos, considerándose una de las causas que generan más daños, junto con la acidificación, en bibliotecas y archivos. Una Humedad Relativa (HR) excesiva ablanda el papel y favorece el desarrollo de microorganismos que se nutren de la celulosa, de la cola del papel o del material de las encuadernaciones.

Las nanopartículas de dióxido de Titanio (TiO_2) se han evaluado en algunas investigaciones sobre conservación de papel, mostrando buenos resultados como agente protector contra los efectos perjudiciales de las radiaciones ultravioletas, los gases contaminantes del medio ambiente y los hongos, [12],[13], y bacterias [13], [14] que afectan al papel. Se ha evaluado también que la aplicación de una capa de nanopartículas de TiO_2 en un polímero de celulosa (hidroxipropilcelulosa) puede actuar como un consolidante de la superficie en donde se aplica, sin alterar las propiedades del TiO_2 y mostrando buen comportamiento en ensayos de resistencia a la tracción, tras envejecimiento acelerado [10], [12].

Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) también han presentado una correcta actividad antibacteriana aunque

se desconoce el mecanismo exacto de actuación [11]. Otra propiedad importante de las nanopartículas de ZnO y de TiO₂ es su capacidad de autolimpieza de las superficies en que se aplican y en presencia de luz UV. Este fenómeno es explicado por su actividad fotocatalítica, capaz de descomponer y mineralizar contaminantes orgánicos [10], [11]. También se ha podido comprobar que previene de la acumulación de suciedad en las superficies, hecho este conocido como “efecto flor de loto” [11].

5. CONCLUSIONES

El uso de nuevas tecnologías, como es la síntesis y aplicación de nanomateriales, al servicio de la conservación y restauración de los documentos sobre papel, es un hecho evidente, a la vista de la gran cantidad de investigaciones que se están llevando a cabo, con unos resultados bastante exitosos. Las suspensiones de nanopartículas que se están evaluando para paliar los efectos de la acidez en el papel y el ataque de microorganismos, por su gran poder de penetración, su mayor reactividad y el alto grado de homogenización en la distribución de los compuestos, amplían la gama de herramientas disponibles para la conservación de documentos, pero también para multitud de obras de arte, pinturas, etc. que han utilizado compuestos celulósicos como soporte. Se abren también nuevas vías de investigación en la aplicación a otros soportes documentales como el pergamino.

REFERENCIAS

- [1] S. Sequeira, C. Casanova, E.J. Cabrita, “Deacidification of paper using dispersions of Ca(OH)₂ nanoparticles in isopropanol. Study of efficiency”, *Journal of Cultural Heritage*, Vol 7, Issue 4, pp. 264-272, Oct/Dec 2006, doi:10.1016/j.culher.2006.04.004
- [2] G. Poggi, N. Toccafondi, L.N. Melita, J.C. Knowles, L. Bozec, R. Giorgi, P. Baglioni, “Calcium hydroxide nanoparticles for the conservation of cultural heritage: new formulations for the deacidification of cellulose-based artifacts,” *Applied Physics A*, vol.114, pp 685-693, 2014, doi: 10.1007/s00339-013-8172-7
- [3] S. Muñoz, *La Restauración del papel*. Ed. Tecnos, Madrid: pp. 70-80, 2010.
- [4] R. Giorgi, L. Dei, M. Ceccato, C. Schettino, P. Baglioni, “Nanotechnologies for Conservation of Cultural Heritage: Paper and Canvas Deacidification” *Langmuir*, 18, pp. 8198-8203, 2002, doi: 10.1021/la025964d
- [5] L.E. Gómez-Villalba, P. López-Arce, R. Fort, M. Álvarez de Buergo, “La aportación de la nanociencia a la conservación de bienes del patrimonio cultural” *Patrimonio cultural de España*, nº 4, pp. 43-55, 2010
- [6] P. Baglioni, D. Chelazzi, R. Giorgi, *Nanotechnologies in the Conservation of Cultural Heritage. A compendium of materials and techniques*. Ed. Springer, New York, pp. 117-141, 2015
- [7] R. Giorgi, C. Bozzi, L. Dei, C. Gabbiani, B.W. Ninham, P. Baglioni, “Nanoparticles of Mg(OH)₂: Synthesis and Application to Paper Conservation”, *Langmuir*, 21, pp. 8495-8501, 2005, doi:10.1021/la050564m
- [8] G. Poggi, MC. Sistach, E. Marín, J.F. García, R. Giorgi, P. Baglioni, “Calcium hydroxide nanoparticles in hydroalcoholic gelatin solutions (GeolNan) for the deacidification and strengthening of papers containing iron gall ink”, *Journal of Cultural Heritage*, 2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.culher.2015.10.005> (in press, corrected proof)
- [9] G. Poggi, R. Giorgi, N. Toccafondi, V. Katur, P. Baglioni, “Hydroxide Nanoparticles for Deacidification and Concomitant Inhibition of Iron-Gall Ink Corrosion of Paper”, *Langmuir*, 26, pp. 19084-90, 2010, doi: 10.1021/la1030944.
- [10] S. Sequeira, E.J. Cabrita, M.F. Macedo, “Antifungals on paper conservation: An overview”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, pp. 67-86, 2012, doi:10.1016/j.ibiod.2012.07.011.
- [11] O.M. El-Feky, E.A. Hassan, S.M. Fadel, M.L. Hassan, “Use of ZnO nanoparticles for protecting oil paintings on paper support against dirt, fungal attack, and UV aging”, *Journal of Cultural Heritage*, vol. 15, pp. 165-172, 2014, doi: 10.1016/j.culher.2013.01.012
- [12] M. Afsharpour, F.T. Rad, H. Malekian, “New cellulosic titanium dioxide nanocomposite as a protective coating for preserving paper-art-works”, *Journal of Cultural Heritage*, vol. 12, pp. 380-383, 2011, doi:10.1016/j.culher.2011.03.001.
- [13] M. Afsharpour, M. Hadadi, “Titanium dioxide thin film: Environmental control for preservation of paper-art-works”, *Journal of Cultural Heritage*, vol.15, pp. 569-574, 2014, doi: 10.1016/j.culher.2013.10.008
- [14] W.A. Daoud, J.H. Xin, Y. Zhang, “Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities”, *Surface Science*, vol. 599, pp. 69-75, 2005, doi:10.1016/j.susc.2005.09.038



Carmen Estrella Monreal recibió el título de Graduado en Conservación y Restauración de Bienes Culturales por la Universidad Politécnica de Valencia en Marzo de 2015. Actualmente cursa el Máster de Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide

Estudio in situ de material arqueológico mediante la técnica LIBS

Elisa Fernández Tudela

Resumen— Debido a sus características y facilidades, la técnica LIBS está siendo cada vez más empleada en el mundo del patrimonio histórico, especialmente en el campo de la arqueología, donde el uso de una técnica que permite realizar análisis multielementales in situ es un gran avance.

Palabras Claves— LIBS, Material Arqueológico, Equipo Portátil, Láser, Mínimamente Invasiva.

1. INTRODUCCIÓN

La capacidad de análisis in situ sobre muestras de diferente naturaleza, y el hecho de ser una técnica mínimamente invasiva, ha hecho que la espectroscopía de ablación inducida por láser (LIBS), sea una herramienta cada vez más empleada en el campo del patrimonio. No obstante, sigue siendo menos común que las técnicas convencionales como son los rayos X o los haz de iones.

En el ámbito de la arqueología, el empleo de técnicas láser ha servido en los últimos años para establecer el análisis de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. Se han empleado también para el diagnóstico estructural mediante técnicas interferométricas láser, además de en tratamientos de limpieza en restauración [1].

Son cada vez más numerosos los estudios mediante LIBS de materiales arqueológicos. Uno de los motivos se debe a que se trata de una técnica mínimamente invasiva, que se puede emplear sobre muestra sin previa preparación o incluso in situ sobre las propias piezas, mediante el empleo de equipos portátiles. Además de aportar información elemental, puede cuantificar sin la necesidad de curvas de calibrado.

En este artículo se expondrán las ventajas y desventajas de esta técnica en el estudio de material arqueológico en diferentes tipología de yacimientos. Además, se hará una revisión de casos prácticos en los que se ha aplicado el análisis mediante LIBS y los resultados obtenidos de ellos.

2. ESPECTROSCOPIA DE ABLACIÓN INDUCIDA POR LÁSER (LIBS)

2.1. Fundamentación

La técnica LIBS emplea un láser, normalmente de Nd:YAG, que al incidir sobre la muestra genera un plasma. Este plasma se trata de la ruptura dieléctrica que produce el láser al incidir y que genera un gas parcialmente ionizado. Estos átomos en estado vapor interactúan con el láser vaporizándose, ionizándose y excitándose, dando lugar al plasma. El estudio de la luz emitida por el plasma en el momento en el que el láser deja de emitir es lo que nos ayuda a detectar los elementos [2].

Cada especie genera unas bandas de emisión características que se encarga de recolectar una lente. Esta información es transportada hasta un espectrómetro.

La instrumentación empleada puede variar en cuanto a su uso. Existen instrumental de laboratorio y equipos portátiles. Estos últimos, a pesar de presentan algunas limitaciones como efectos matriz o límites de detección mayor que los equipos de laboratorio, su empleo para el estudio in situ esta aumentando en el uso en patrimonio, permitiendo obtener de manera sencilla y rápida información elemental y cuantificación de materiales en cualquier estado (sólidos, líquidos o aerosoles) [3].

2.2. Aplicación LIBS en patrimonio

En estos últimos años hemos podido ver como el estudio mediante la técnica LIBS se ha introducido en el ámbito del patrimonio. Su aplicación permite la identificación elemental o molecular, que por medio de su intensidad espectral permite también cuantificar. Esta cuantificación se puede realizar bien mediante patrones con una exactitud del 2-3%, o mediante la modelización de la pluma sin el empleo de estándares, en este caso se puede obtener una semicuantificación [1].

La variedad de materiales de naturaleza tanto orgánica como inorgánica es muy amplia. Estudio de pigmentos, metales, material petreo, biomateriales, productos de alteración, etc.

Además el hecho de tratarse de una técnica portátil ha favorecido el estudio en entornos tan variados como yacimientos subacuáticos, cuevas o incluso en las mismas salas de museos y galerías sin necesidad de transportar el material al laboratorio. Uno de estos ejemplos de aplicación es el caso del estudio de la capa de alteración en la Cueva de Nerja (Málaga) o la caracterización a distancia de la fachada de la Catedral de Málaga [4]. En otros casos también ha ayudado a detectar falsificaciones detectando posibles materiales envejecidos [5].

2.3. LIBS frente a otras técnicas de análisis.

Las principales ventajas que aporta esta técnica al estudio es su naturaleza cualitativa y cuantitativa, multielemental, sin necesidad de preparado en las muestras, posibilidad de estudio in situ e incluso análisis remoto, rapidez

(casi a tiempo real), capacidad de estudio estratigráfico mediante la ablación del láser y su naturaleza mínimamente invasiva.

Si es cierto que existen algunas limitaciones de la técnica, un ejemplo es la disminución de sensibilidad y reproducción frente a otras técnicas convencionales, para ello se ha estudiado el empleo de LIBS de doble pulso. Lo que ha permitido aumentar su eficacia de análisis [6].

3. ESTUDIO DE MATERIAL ARQUEOLÓGICO

En el campo de la arqueología el análisis LIBS ha aportado muchos estudios tanto en laboratorio como con el empleo de su variedad portátil, ya que este hecho hace que sea posible el análisis en yacimientos menos favorables estudio como pueden ser los yacimientos subacuáticos, las cuevas, yacimientos sin extracción de materiales, etc.

El uso más común es el estudio elemental de metales y cerámicas, pero además el análisis cuantitativos de este tipo de materiales nos puede aportar información sobre la procedencia, la técnica de fabricación o su decoración. Siendo muy importante la capacidad de esta técnica para el estudio estratigráfico que nos aporta información más allá de la superficie. Además de estos materiales, también encontramos estudios de vidrios y sus elementos ligeros o biomateriales [7].

A continuación se exponen algunos casos tanto de investigación como de aplicación real de esta técnica en el campo de la arqueología.

Antes de nada conviene hacerse una idea del aspecto de un instrumento LIBS portátil que puede verse en la Figura 1. Se trata de un ejemplo expuesto por un equipo de investigación de la Universidad de Glasgow, dentro de un proyecto iniciado en 2007 y dedicado al estudio de la aplicación de LIBS y Raman en el análisis de pinturas y material arqueológico. En su web muestran un instrumento LIBS portátil realizado por Demetris Anglos (FORTH-IESL) [8]. De esta manera nos podemos hacer una idea de la ventaja de uso a la hora de necesitar un análisis in situ.

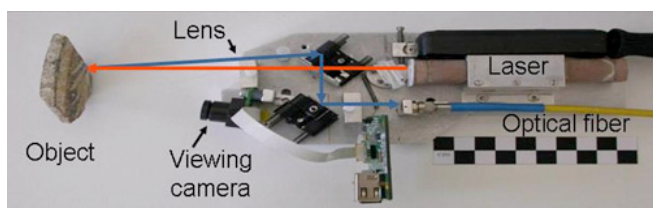


Fig. 1. Equipo LIBS portátil, propiedad de Demetris Anglos (FORTH-IESL).

3.1. Casos prácticos

Uno de los empleos de aplicación en arqueología es la clasificación de cerámicas en función de su procedencia. Se empleó en este caso la espectroscopía de plasma inducido por láser para crear un sistema de clasificación de muestras en un total de 36 fragmentos de Terra Sigillata. Los espectros obtenidos dieron unos resultados característicos según el área de procedencia. Este estudio mediante el análisis de unos patrones y algoritmos de redes

neuronales pretende sistematizar la clasificación de cerámicas según sus características [9].

Otro ejemplo, en este caso en bronce, es el estudio realizado in situ sobre doce estatuillas expuestas en el Museo Arqueológico Nacional de Crotona [10]. El propósito era analizarlas y encontrar elementos característicos que permitiesen distinguirlas y compararlas con otros estudios para encuadrarlas cronológica y estilísticamente.

Pero sin duda una de las últimas novedades en la aplicación LIBS, es el estudio in situ de yacimientos subacuáticos empleando la fibra óptica para la identificación de materiales sin necesidad de extracción a la superficie. El estudio lo ha llevado a cabo la Universidad de Málaga empleando dos métodos, el pulso-simple convencional y el multi-pulso que al aumentar la cantidad de láser se obtuvieron mejores resultados. Se realizaron las pruebas en dos pecios dando buenos resultados [11].

4. CONCLUSIONES

Las ventajas que presenta la técnica LIBS hace de esta una forma muy eficaz de estudio en el patrimonio histórico. Además, se puede emplear conjuntamente con otras técnicas y así obtener unos resultados muy completos.

En el caso de la arqueología es aún más útil ya que en muchas ocasiones es necesario el estudio in situ en el mismo yacimiento. El hecho de que se estén estudiando sus aplicaciones en entornos como el fondo del mar hace que se pueda apreciar un prometedor avance en la técnica y su aplicación.

REFERENCIAS

- [1] F.J. Fortes Román, L.M. Cabalín Robles, J.J. Laserna Vázquez, "Aplicaciones de las técnicas láser en el análisis y conservación del patrimonio", Revista PH: Instituto Andaluz del Patrimonio Histórico, no. 74, pp 74-93, mayo 2010.
- [2] J. Anzano, R.J. Lasheras y C. Bello-Gálvez, "Espectroscopía de decomposición inducida por láser (LIBS): una técnica emergente en la química analítica", *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences at the Universidad del Zulia*, volumen 18, no.3, pp. 179-187, 2010.
- [3] P. Vega, "Desarrollo y evaluación de técnicas espectroscópicas basadas en plasmas inducidos por láser y en descargas luminiscentes estimuladas con campos magnéticos para el análisis directo de sólidos", Departamento de Física, Universidad de Oviedo, (Tesis Doctoral).
- [4] F.J. Fortes Román, L.M. Cabalín Robles, J.J. Laserna Vázquez, "Diagnóstico y conservación del patrimonio mediante técnicas basadas en láser", *Boletín Graseqa, Arqueometría: El Papel de la Química Analítica en la Protección del Patrimonio Histórico*, no. 1, pp 3-28, enero 2012.
- [5] Web de Ocean Optics. <http://halmapr.com/news/oceanoptics-es/2010/07/12/la-tecnologia-libs-de-ocean-optics-detecta-las-antiguedades-falsas/> (Enlace web).
- [6] V. Piñón, D. Anglos, G. Nicolás, "Improvement of laser induced breakdown spectroscopy technique using double pulse schemes", *Óptica Pura y Aplicada*, Volumen 43, no 2, pp. 113-117, 2010.
- [7] R. Mayo, "El uso de la técnica láser LIBS en Arqueología", *CIEMAT: Vértices*, no. 8, pp. 18-22, 2008.

- [8] Web Universidad de Glasgow.
<http://www.gla.ac.uk/schools/humanities/research/archaeologyresearch/projects/non-destructiveanalysis/> (Enlace web).
- [9] A. Ramil, A.J. López, A.J. Yáñez, "Clasificación de cerámicas arqueológicas por espectroscopía LIBS mediante la utilización de redes neuronales artificiales aplicación a la Terra Sigillata", *Férvedes: Revista de Investigación*, no. 8, pp. 63-68, 2008.
- [10] D. Díaz Pace, L. Pardini, G. Lorenzetti, F. Anabitarte García, V. Palleschi, S. Legnaioli y A. Foresta, "Análisis LIBS de doce estatuillas de bronce expuestas en el Museo Arqueológico Nacional de Crotona", *Óptica pura y aplicada*, vol. 45, no. 3, pp. 277-286, 2012.
- [11] F.J. Fortes, M. López-Claros, S. Guirado, J. Laserna, "LIBS en patrimonio cultural: reconocimiento e identificación de objetos en yacimientos arqueológicos sumergidos", *PH Investigación*, no. 5, 2015.



Elisa Fernández Tudela recibió el título de graduada en Conservación y Restauración de Bienes Culturales por la Universidad de Granada (2015). Actualmente trabajando en obras de restauración. Cursa el Máster de Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide.

Canteras romanas en el sur de la península ibérica

Cristina Gómez Fernández

Resumen—Durante la época romana existieron numerosas explotaciones de piedra en toda la península ibérica. Este artículo se centra en los tipos de canteras, instrumentos empleados para la extracción del material y ubicación de las principales canteras del sur de la península ibérica.

Palabras Claves—Cantera, romana, bética.

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente artículo es analizar y conocer las diferentes canteras en el sur de la Península Ibérica en época romana. Durante esta época la decisión de dónde ubicar una ciudad tenía que tener en cuenta numerosos factores, era esencial que tuviese buena accesibilidad, dotación de agua, recursos naturales para poder abastecer a los habitantes y por supuesto disponer de materia prima para poder construirlas. En este sentido, la cercanía con las canteras implicaba crecimiento y desarrollo para las ciudades [1].

A partir de los años 80 cobró especial relevancia el estudio de canteras en territorio español. Destaca el trabajo realizado por M. Cisneros Cunchillos, que aunque actualmente se encuentre desfasado sirvió para conocer los materiales empleados en la península ibérica en época romana, tanto a nivel arqueológico como a nivel analítico [2]. Cobra especial relevancia los estudios de Arqueología de la Arquitectura en este campo, gracias a los cuales se puede conocer con mayor detalle y certeza las técnicas constructivas, los instrumentos y las tipologías empleadas. Debido a la extensión del territorio de la península, no se puede considerar una única técnica constructiva. Esta vendrá condicionada por el material empleado; la forma de trabajarlo, que variará de una región a otra y la forma de construir, determinada por el conocimiento de cada pueblo [3].

2. CANTERAS BÉTICAS

En el sur de la península ibérica existen numerosas canteras. La mayoría comenzaron a ser explotadas en época de Augusto, teniendo su mayor auge en el siglo I y decayendo a lo largo del siglo II. La mayor parte de la piedra que salió de las canteras béticas fue empleada como elementos arquitectónicos, revestimientos y esculturas [4].

2.1. Tipos de canteras

Tradicionalmente existían dos tipos de canteras, a cielo abierto y en profundas galerías.

En los **yacimientos a cielo abierto** la extracción se iba haciendo de forma escalonada. La piedra se extraía en forma de paralelepípedo (figura 1) [5] y [6].



Fig. 1. Ejemplo de yacimientos a cielo abierto [6]

Por el contrario, en las **canteras subterráneas** se iba excavando en la roca y formando galerías y salas que podían variar de tamaño. Por lo general, cuando esas galerías eran explotadas se acumulaban en ellas los desechos de las nuevas galerías, por lo que hoy en día muchas de ellas permanecen enterradas. Tradicionalmente, estas canteras excavadas se sostenían de forma natural (figura 2) y en otras ocasiones se reforzaban con pilares y vigas horizontales en las zonas de mayor dimensión [7].

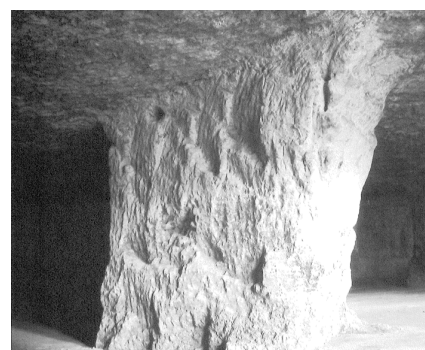


Fig. 2. Pilar sustentando una de las galerías. Cantera de Peñateja, Córdoba [7].

2.2. Instrumentos empleados

Los instrumentos que empleaban los romanos para la extracción del material eran muy similares a los que se utilizan hoy en día. Estaba compuesto por martillos, picos, trinchantes o hachas entre otros [6] (figura 3).



Fig.3. Herramientas romanas [9]

Según Vitrubio, la forma ideal de preparar las piedras que se fuesen a emplear en construcción era sacándolas dos años antes de la cantera y en época de verano [8]. En un primer momento estas piedras tenían cortes muy irregulares y variados. La forma de construir los muros era colocando las rocas unas encima de otras en hileras y sin importar el tipo de piedra. Posteriormente, esta percepción cambió y se empezó a trabajar con bloques homogéneos de grandes dimensiones [5] por lo que los instrumentos cambiaron y se fueron adaptando a las nuevas demandas.

2.2. Canteras Béticas

Entre las canteras béticas, destaca la de Macael, de la que se obtenía mármol blanco y la de Lubrín, ubicada en el cerro de la Atalaya, y de la que se obtenía un mármol en tonos blanco-grisáceo y gris-negro. Estas dos canteras se encontraban en la zona de Almería y sus piedras eran empleadas en esculturas y elementos arquitectónicos. En la provincia de Granada encontramos canteras de piedra arenisca en Escúzar y de piedras caliza y dolomías en Atarfe. Eran empleadas en elementos arquitectónicos y como aplacados conmemorativos. En la zona de Málaga existieron varias canteras, como la de Coín, de la que se obtenía mármol blanco; Mijas, mármoles grisáceos y blancos; Alhaurín el Grande, con tonos grises y cremas; Alhaurín de la Torre, mármol blanco y gris; Monda, con mármoles de tonos blanco-grisáceo y finalmente la de Antequera, de la que se obtenía caliza blanca empleada fundamentalmente en elementos arquitectónicos.

En la provincia de Cádiz era conocida la cantera de Tarifa, de la que se extraía caliza oolítica empleada en Itálica. En esta zona también existieron canteras de arenisca y caliza. Las canteras de Cabra, ubicada en Córdoba, tenían piedra caliza oolítica en tonos blanco-crema y era empleada fundamentalmente en esculturas, aplacados y elementos arquitectónicos. Por último, en la provincia de Sevilla destacó la cantera de mármol blanco de Almadén de la Plata, cuya piedra era empleada en esculturas, ar-

quitectura y soportes. Gran parte de esta cantera fue empleada en Itálica [4].

3. CONCLUSIONES

Las canteras implicaban un gran beneficio para la población, tanto a nivel económico como a nivel de desarrollo. Una cantera suponía grandes beneficios económicos puesto que las piedras eran necesarias y en función de la tipología a la que perteneciesen más o menos cara. Este beneficio era aún mayor si no eran de explotación imperial y pertenecía a la ciudad [10]. También conllevaba una gran transformación para el núcleo poblacional ya que una cantera atraía a comerciantes.

En un principio las vías de comunicación (figura 4) eran para desplazarse el ejército, pero posteriormente contribuyó al desarrollo del comercio. Se desarrollaron importantes vías de comunicación alrededor de las canteras [10]. En otras ocasiones era al revés, ya que se aprovechaban las vías existentes para ubicar las nuevas canteras [7]. En cualquier caso, no todos los municipios contaban con canteras por lo que era necesario ese intercambio de materiales. Con todo lo anterior, se puede constatar la importancia de las canteras para los municipios.



Fig.4. Estado actual de calzada romana en la provincia de Cádiz [11]

REFERENCIAS

- [1] J. Atienza Fuente, "Explotación de canteras para la obtención de material constructivo en época romana: el ejemplo de Segóbriga", *Actas del Sexto Congreso Nacional de Historia de la Construcción, Valencia*, pp. 119-128, Octubre 2009.
- [2] A. Gutiérrez García-Moreno, "Recursos lapídeos del noreste de la península ibérica en época romana: canteras y ciudades", *International Congress of Classical Archaeology meetings between cultures in the ancient mediterranean, Bolletino di Archeologia on line*, vol. speciale A/ AB/2, pp. 13-33, 05-08-2010, ISSN 2039 - 0076.
- [3] A. Pizzo, "Proposal for recording and classifying the Roman building techniques", *Arqueología de la Arquitectura*, vol. 7, pp. 277-286, enero-diciembre 2007, doi: 10.3989/arqarqt.2010.10014.
- [4] A. Padilla Monge, "Consideraciones en torno a la explotación del mármol en la bética durante los siglos I-II", *Universidad de*

Sevilla, pp. 271-281, 1999.

- [5] S. F. Ramallo Asensio, R. Arana Castillo, *Canteras Romanas de Carthago Nova y alrededores (Hispania citerior)*, Universidad de Murcia, Unidad Gráfica Murcia, ISBN 84-7684-076-4.
- [6] M.D. del Amo, "Aportación al estudio de las canteras romanas de la zona arqueológica de *Els Munts*", *Estudis altafullencs*, vol. 5, pp. 5-25, 1981.
- [7] F. Penco Valenzuela, "La cantera romana de Peñatejada: un yacimiento único en el término municipal de Córdoba", *Antiquitas*, vol. 14, pp. 45-53, 2002.
- [8] M. Vitrubio, *Los Diez libros de la Arquitectura*, Libro II, Alianza Editorial, 2004, ISBN 9788420671338.
- [9] A. Escarpa, *Historia de la ciencia y de la técnica*, Ediciones Akal S.A. 2000, Madrid, pp. 14, ISBN 84-460-0996-x.
- [10] B. León del Río, "El proceso de creación en la escultura romana de mármol a través de la colección del Museo Arqueológico Provincial de Sevilla", Facultad de Bellas Artes, Universidad de Sevilla, 1996.
- [11] Web de la Junta de Andalucía
<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/servtc5/ventana/mostrarFicha.do?jsessionid=AEFC5113037B98717C6BB2AA687F8842?idEquipamiento=19411> [visitado 15-02-2016].



Cristina Gómez Fernández recibió el título de Arquitecto por la Universidad de Sevilla en 2014. Actualmente trabaja como arquitecta colaborando en varios proyectos y cursa el Máster en Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad de Pablo de Olavide.

La gestión de riesgos de las Colecciones de los Museos.

Cándida Bermejo Palomino

Resumen— La gestión de riesgos de las Colecciones de los Museos requiere de procedimientos claros e intervenciones aplicables. En este sentido, los manuales de gestión de riesgos han de servir como referencia, a los responsables de la conservación, para la adopción de métodos particulares, sostenibles y eficaces.

Palabras Claves— Museos, evaluación y gestión de riesgos, conservación preventiva.

1. INTRODUCCIÓN

Hace cien años, la preservación de las colecciones de los museos consistía en reparar y reconstituir objetos valiosos. Desde entonces ha evolucionado, incorporando la necesidad de prevenir futuros deterioros, a la denominada “conservación preventiva” [1].

Según la definición del Comité para la Conservación del ICOM (Delhi, 2008), la conservación preventiva abarca “todas aquellas medidas y acciones que tengan como objetivo evitar o minimizar futuros deterioros o pérdidas. Se realizan sobre el contexto o el área circundante al bien, o más frecuentemente un grupo de bienes, sin tener en cuenta su edad o condición. Estas medidas y acciones son indirectas, no interfieren con los materiales y estructuras de los bienes y no modifican su apariencia” [2].

El objetivo de la gestión de riesgo en los museos es conservar las colecciones de la mejor forma posible, con los recursos limitados disponibles. Por tanto, la gestión de riesgos extiende el concepto de la conservación preventiva, al insistir en un método que compara la rentabilidad y la eficacia de las medidas de preservación. [1], [3].

2. LA GESTIÓN DE RIESGOS EN LOS MUSEOS

En los años setenta, reconocidas instituciones internacionales como el Getty Conservation Institute, el ICCROM o el Canadian Conservation Institute, comienzan a implantar el concepto de prevención como principio de conservación del patrimonio cultural. Se organizan los primeros congresos y cursos y surgen las primeras publicaciones sobre conservación preventiva [4].

En España, en marzo de 2011, se aprueba El Plan Nacional de Conservación Preventiva que pretende impulsar la estrategia de conservación preventiva en función de unos principios básicos y unas herramientas metodológicas [4].

En lo referente a los museos, las diferentes leyes y normativas estipulan una serie de medidas, que las instituciones deben cumplir, entre las que se encuentra la conservación. Así ocurre en los grandes museos, donde se han implementado planes de conservación preventiva, aunque la situación es muy distinta en los medianos y, sobre todo, en los pequeños museos, de menos de 10 tra-

bajadores y con recursos limitados, donde las tareas de conservación preventiva, si es que se realizan, no siempre forman parte de un proyecto global de conservación preventiva que incluya, la identificación, evaluación y gestión del riesgo[4].

En todos los casos, pero especialmente en los pequeños museos, la utilización de manuales de gestión de riesgos para las colecciones pueden servir, a modo de guía, para establecer un método de trabajo de aplicación práctica que permita trazar una estrategia de conservación preventiva sostenible y eficaz [5].

3. LOS MÉTODOS DE GESTIÓN DE RIESGOS

Los distintos métodos de gestión de riesgos hacen énfasis en la naturaleza cíclica de la gestión de riesgos [3], como muestran los siguientes ejemplos:

La preservación de las colecciones, según Michalski (2006), es una actividad cíclica, concertada en varias etapas, que debe ser coordinada en el seno de otros ciclos de planificación del museo [1], (véase Fig. 1).

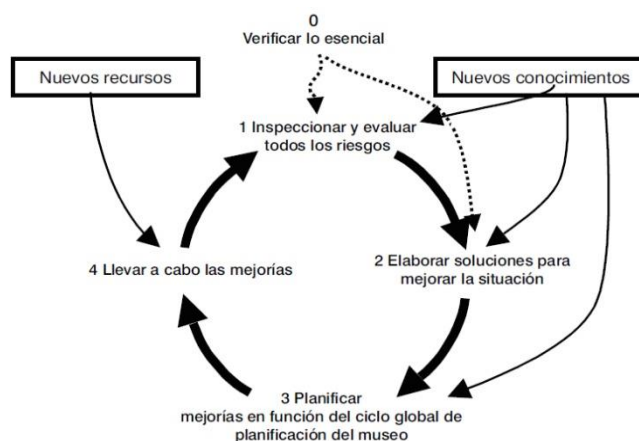


Fig. 1. Etapas del ciclo de preservación de las colecciones propuesto por Stefan Michalski (2006). Fuente [1].

El segundo ejemplo, es el proceso propuesto por el manual de gestión de riesgos de colecciones ICCROM (2009), adaptado de la norma técnica Australian/New Zealand Standard for Risk Management, (véase Fig. 2). Consta de 5 pasos secuenciales (los campos horizontales

en la mitad del esquema) y dos pasos continuos (las columnas de soporte a ambos lados) [3].



EL CICLO DE GESTIÓN DE RIESGOS

Fig. 2. Proceso propuesto por el manual de gestión de riesgos de colecciones ICCROM (2009). Traducción fuente [3].

Los métodos propuestos en estos manuales, aunque no son idénticos, se basan en estudiar el contexto, identificar y evaluar los riesgos y, tratar cada riesgo mediante la puesta en marcha de soluciones particulares.

3.1. Identificación de riesgos

Para identificar los riesgos que corren las colecciones es necesario realizar un estudio previo, sistemático y exhaustivo, del entorno del museo, el propio edificio, las salas, el mobiliario y las colecciones, la historia del museo, las actividades del personal, los procedimientos, etc. [1].

Se pueden utilizar distintas formas de clasificar e inventariar las posibles causas de pérdida o deterioro de las colecciones, entre ellas, el sistema de clasificación de causas elaborado por el Instituto Canadiense de Conservación (ICC), según el cual, existen nueve agentes de deterioro que provocan deterioro o pérdidas en las colecciones [1], (véase tabla 1)

TABLA 1
PRINCIPALES AGENTES Y FORMAS DE DETERIORO ASOCIADAS EN LAS COLECCIONES DE LOS MUSEOS [1]

Agentes de deterioro	Forma de deterioro y materiales vulnerables
Fuerzas físicas directas: Guerra, temblores de tierra, mal almacenaje o manipulación, tránsito dentro y fuera del museo.	Rotura, deformación, perforación, oquedades, arañazos, abrasión en todo tipo de objetos
Robo, vandalismo, pérdida	Pérdida o mutilación del objeto
Fuego: Provocado por sistema eléctrico defectuosos, construcciones adyacentes, ect.	Dstrucción total, quemaduras, depósitos de hollín y residuos de humo. Daño colateral provocado por el agua.
Agua: Inundaciones o humedades debido a techos, conductos de agua y alcantarillado defectuosos, etc.	Contornos de manchas o efloroscencias sobre los materiales porosos. Dilatación, aflojamiento, rotura separación de capas, levantamientos, combadura, etc., de los materiales orgánicos. Encogimiento de telas Corrosión de los metales
Plagas: Microorganismos, insectos, pequeños animales como roedores y aves debido a la presencia de vegetación y/o basura en el perímetro del edificio, entrada de visitantes, introducción de	Dstrucción, perforación, desgaste, de materiales orgánicos. Emisión de sustancias o excrementos que destruyen, manchan, debilitan o desfiguran los materiales de las obras.

alimentos, etc.	
Contaminantes: Gases, líquidos y sólidos por la contaminación urbana y/o natural, materiales: de construcción, de embalaje, de mantenimiento y de las obras de arte.	Desintegración, decoloración o corrosión sobre todo de los materiales porosos y reactivos.
Radiaciones: Emisión de radiación ultravioleta, infrarroja y visible por la entrada de luz natural o la iluminación eléctrica.	Desintegración, decoloración, oscurecimiento, amarilleo de la superficie de materiales orgánicos y de materiales coloreados. Decoloración u oscurecimiento de la capa externa opaca de pinturas y de la madera.
Temperaturas: Demasiado elevadas o demasiado bajas y fluctuaciones que puede deberse al clima local, luz del sol e instalaciones técnicas defectuosas.	Alteración de los colores y desintegración progresiva de materiales orgánicos. Friabilidad que provoca el agrietamiento de la pintura y de otros polímeros. Arietamiento y separación de las capas de los materiales sólidos quebradizos.
Índices de humedad Relativa: Superior o inferior a un umbral determinado y fluctuaciones, debido al clima local, instalaciones de agua defectuosas, paredes frías, ventilación inadecuada, etc.	Hidratación o deshidratación de algunos minerales y corrosión de los metales. Alteración de los colores y desintegración progresiva de los materiales orgánicos Encogimiento, dilatación, agrietamiento, levantamientos y separación de juntas, etc., en materiales higroscópicos.

3.2. Evaluación de riesgos

Una vez identificados los riesgos es necesario evaluarlos. El principal objetivo de una evaluación de riesgos es ayudar a un museo a identificar y colocar en orden de prioridad las situaciones problemáticas, evaluar sus necesidades ambientales, establecer regímenes apropiados de mantenimiento y administración, e implementar soluciones sostenibles y apropiadas [6].

A continuación se expone, como referencia, el método de evaluación de riesgos para colecciones de museo elaborado por S. Michalski, Instituto Canadiense de Conservación (2006), que utiliza escalas sencillas de orden de magnitud de los riesgos [1], (véase tabla 2).

TABLA 2
ESCALAS PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS [1]

¿Cuándo se producirá el riesgo? (probabilidad de deterioro)		
Puntos	Riesgos que se producen como acontecimientos diferentes	Riesgos que se acumulan progresivamente
3	Se produce alrededor de una vez al año	El deterioro se producirá dentro de cerca de un año
2	Se produce alrededor de una vez cada 10 años	El deterioro se producirá dentro de cerca de 10 años
1	Se produce alrededor de una vez cada 100 años	El deterioro se producirá dentro de cerca de 100 años
0	Se produce alrededor de una vez cada 1000 años	El deterioro se producirá dentro de cerca de 1000 años
¿Hasta qué punto será dañado cada objeto afectado? (pérdida proporcional de valor)		
3	Pérdida total o casi total del artefacto	(100%)
2	Deterioro significativo pero limitado en cada objeto	(10%)
1	Deterioro moderado o reversible en cada objeto	(1%)
0	Deterioro que apenas se nota en el objeto	(0.1%)
¿Cuál es la proporción de la colección que se ve afectada? (fracción de la colección en riesgo)		
3	Totalidad o mayor parte de la colección	(100%)
2	Una importante fracción de la colección	(10%)
1	Una pequeña fracción de la colección	(1%)
0	Un objeto	(0.1% o menos)
¿Cuál es la importancia de los objetos afectados? (valor de los objetos en riesgo)		
3	Muy superior al valor promedio (100 veces el valor promedio)	
2	Superior al valor promedio (10 veces el valor promedio)	
1	Importancia media para esta colección	
0	Inferior al valor promedio para esta colección (1/10 del valor promedio)	

Total máximo de los puntos. Ejemplo:	
¿Cuándo se producirá?	3
¿Hasta qué punto será dañado cada objeto afectado?	3
¿Cuál es la proporción de la colección que se ve afectada?	3
¿Cuál es la importancia de los objetos afectados?	1
Intensidad del riesgo total (total de los puntos señalados anteriormente)	10
Nota: Es imposible obtener más de 11 puntos. Si toda la colección corre riesgo entonces la importancia de cada objeto no puede ser superior al promedio y si el 10% de la colección corre riesgo la importancia no puede ser 10 veces superior al valor promedio. Es posible asignar puntos intermedios (por ejemplo 2.5).	

El ejemplo de la tabla 2, muestra que, para obtener el total máximo de los puntos, se debe responder a cuatro cuestiones que son fundamentales en la evaluación de riesgos. La intensidad del riesgo es, por tanto, la suma de estos cuatro componentes. El total representa la intensidad del riesgo específico identificado [1].

A partir del total de los puntos se obtiene las siguientes categorías de prioridades [1]:

- **9-10: Prioridad extrema:** posibilidad de perder toda la colección en un futuro próximo o muy cercano. Proviene, típicamente, de una gran probabilidad de incendio, inundación, temblor de tierra o atentado.
- **6-8: Prioridad urgente:** posibilidad de pérdidas o de deterioro sustanciales en una parte significativa de las colecciones en un futuro próximo. Suele provenir de problemas relacionados con la seguridad o con índices muy elevados de deterioro, a causa de la luz, los rayos ultravioletas o la humedad.
- **4-5: Prioridad moderada:** posibilidad de deterioros moderados en algunos objetos dentro de algunos años o, posibilidad de pérdidas o deterioro sustanciales, dentro de varias décadas.
- **1-3: Mantenimiento del museo:** posibilidad de deterioro moderado o riesgo moderado de pérdida dentro de varias décadas. Relacionado con las labores de seguimiento y mantenimiento que los museos deben garantizar.

3.3. El tratamiento de los riesgos

Una vez identificados y evaluados los riesgos se han de seleccionar y planificar las distintas estrategias, basadas en la adopción de soluciones particulares [7].

Las estrategias recomendadas, deben servir como base de un plan de conservación de la colección que tome en cuenta tanto los requerimientos de la colección como los del edificio [6].

Se debe tener en cuenta, además, la sostenibilidad de las medidas mediante la evaluación de los costes y recursos requeridos [1].

4. CONCLUSIONES

La finalidad de la gestión de riesgos en los museos es valorar los riesgos de una colección y actuar para reducirlos de la manera más efectiva posible, considerando las

herramientas y recursos prácticos de los que se puede disponer [3].

Se deben adoptar métodos de evaluación de riesgos, fáciles de aplicar, que permitan la elección de las soluciones apropiadas para mejorar la conservación de las colecciones. Estos métodos deben contemplar todas las variables involucradas, relacionadas con el edificio, la colección y las cuestiones de organización [6], [7].

Los manuales de gestión de riesgos y métodos de evaluación no deben ser entendidos como modelos definitivos, sino que, han de servir como referencia para los responsables de la conservación, en especial de los pequeños museos que, suelen disponer de recursos limitados [7].

REFERENCIAS

- [1] S. Michalski, "Preservación de las colecciones". *Cómo administrar un museo: Manual práctico*, ICOM, París, pp. 51-90. 2006. [en línea]. [Consulta: 8 de Junio 2016]. disponible en: http://geic.com/files/grupoconservacionpre/Michalski_preservacion_colecciones.pdf
- [2] I. M. García, "Historia de la Conservación Preventiva. Parte II". *Ge-conservación*, no 6, pp. 5-18, 2014, ISSN: 1989-8568
- [3] S. Michalski, & J. L. Pedersoli Jr, "Manual de gestión de riesgo de colecciones". ICCROM-CCI-RCE, 2009. [en línea]. [Consulta: 8 de Junio 2016]. disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0018/001862/186240s.pdf>
- [4] E. González, "La gestión de la conservación preventiva en las instituciones". *Conservación preventiva: revisión de una disciplina*. Patrimonio Cultural de España, 7 (número monográfico), Secretaría General Técnica. Subdirección General de Documentación y Publicaciones, pp. 33-41, 2013, NIPO: 030-13-139-9
- [5] J. A. Herráez, G. Enríquez, M.ª J. Pastor, T. Gil, "Manual de seguimiento y análisis de condiciones ambientales". Secretaría General Técnica. Centro de Publicaciones. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2014, NIPO: 030-14-078-7
- [6] Getty Conservation Institute "Objetivos y metodología para una Evaluación para la conservación", *Evaluación para la conservación: modelo propuesto para evaluar las necesidades de control del entorno museístico*, versión 9/99, Malibú: GCI, pp. 1-9, 1999. [en línea]. [Consulta: 9 de Junio 2016]. disponible en: http://www.getty.edu/conservation/publications_resources/pdf_publications/pdf/assessmodels.pdf
- [7] V. D'agostino, F. R. D. A. Alfano, B. I. Palella, & G. Riccio, "The museum environment: A protocol for evaluation of microclimatic conditions". *Energy and Buildings*, no.95, pp. 124-129, 2015, doi: [org/10.1016/j.enbuild.2014.11.009](https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2014.11.009)



Cándida Bermejo recibió el título en Conservación y Restauración de Bienes Culturales en la especialidad de escultura por la Escuela Superior de Arte del Principado de Asturias en 2015 y de Técnico Superior en Artes Aplicadas a la Piedra en 2000. Actualmente, cursa el Máster de Diagnóstico del Estado de conservación del Patrimonio Histórico que imparte la Universidad Pablo de Olavide.

¿Por qué la música de Bach no suena igual?

Teresa Palomar Sanz

Resumen— La alteración producida en los tubos metálicos de los órganos históricos ha inducido una pérdida de la calidad del sonido de estos instrumentos e incluso la pérdida de algunas notas musicales por el silencio de sus tubos. Diversos estudios microclimáticos han confirmado que la corrosión detectada en los tubos de plomo es debida a la acumulación de ácido acético y fórmico emanado de la madera de los propios órganos. Estas especies pueden catalizar de manera exponencial la corrosión del plomo formando cerusita e hidrocerusita, así como fisuras y agujeros. Las medidas de conservación preventiva de estos instrumentos deben contemplar las medidas de ventilación del interior de los órganos para minimizar el daño provocado por la acumulación de dichas especies ácidas.

Palabras Claves— Órganos, corrosión, tubos de plomo, ácidos carboxílicos.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha observado una pérdida en la calidad del sonido de la música tocada en los órganos históricos de toda Europa debido a los problemas de corrosión que sufren sus tubos metálicos.

El órgano es un instrumento musical en el cual el sonido es producido por el paso del viento a través de numerosos tubos plomo o de aleación plomo-estaño. Los tubos suelen estar abiertos en la parte superior y con forma cónica en la inferior. El aire entra a través de la parte inferior haciendo vibrar el tubo y sale a través de un labio situado en una zona aplanada encima la zona cónica produciendo el sonido (Fig. 1 a y b). El organista elige qué tubos van a sonar gracias a palancas, llaves y pedales [1].

El primer órgano del que se tiene constancia fue construido aproximadamente en el 246 d.C. por un artesano griego en Alejandría, pero no fue hasta los siglos XVII y XVIII cuando se produjo el gran desarrollo europeo de los órganos con la música barroca de la que Johann Sebastian Bach fue el gran compositor [1, 2].

Dada la importancia de preservar los órganos como bien material, así como las piezas musicales tocadas en estos instrumentos es necesario conocer las principales patologías y mecanismos de degradación de los tubos de los órganos y aportar unas medidas de conservación preventiva para minimizar el daño debido al microambiente al que están expuestos.

2. ESTUDIO MICROCLIMÁTICO

En el marco del proyecto europeo COLLAPSE (*Corrosion of Lead and Lead-tin Alloys of Organ Pipes in Europe*), los investigadores eligieron varios órganos de distintas localizaciones europeas y se evaluaron las condiciones microclimáticas en las que se encontraban [3]. Para ello, se utilizaron diferentes equipos pasivos y activos de captura de ácidos orgánicos en el interior del órgano, fuera de éste y en el interior de la iglesia pero alejado del instrumento. El ácido acético se captó con tubos adsorbentes de Tenax TA y el ácido fórmico fue muestreado con unos cartuchos

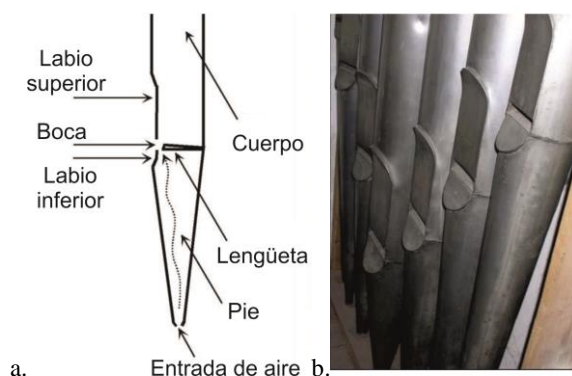


Fig. 1. a) Ilustración esquemática de los tubos de un órgano barroco. b) Tubos del órgano Casparini (1776) (Vilnius, Lituania). Figura extraída de la referencia [1].



Fig. 2. Captador activo analizando el aire en el interior de un órgano. Figura extraída de la referencia [3].

recubiertos de NaOH (Fig. 2), posteriormente los cartuchos fueron analizados en el laboratorio [3].

Se detectó una elevada concentración de ácido acético y moderada de ácido fórmico dentro de la caja de viento de muchos de los órganos. En el órgano de Oegstgeest (Holanda) se detectó ~ 1400 ppb de ácido acético y ~ 180 ppb de ácido fórmico. Mientras que fuera del órgano y en la iglesia se detectaron únicamente trazas de ácido acético [3]. De este estudio microclimático se puede concluir que

la principal fuente de ácidos orgánicos es el órgano en sí mismo.

Las principales patologías de corrosión se han localizado al pie de los tubos metálicos, donde el metal está en contacto con la madera (Fig. 3 a). Se ha observado, asimismo, que la corrosión se va moviendo progresivamente hacia arriba formando fisuras y agujeros, y si el ataque está muy avanzado el tubo puede colapsar (Fig. 3 b). Como resultado del ataque, el sonido del tubo va alterándose hasta quedar en silencio, modificando, por tanto, el sonido de la pieza musical [3].

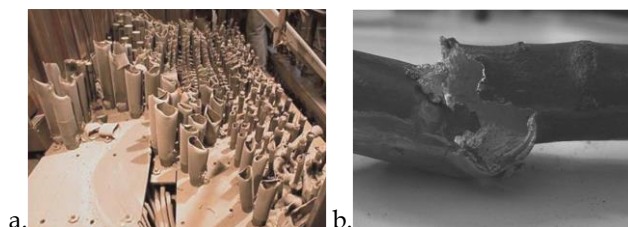
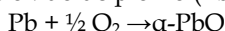


Fig. 3. Patologías de alteración en a) el órgano Cavaillé-Coll (Burgos), b) el órgano Stellwagen (Lübeck, Alemania). Figuras extraídas de las referencias [4, 5].

Las especies ácidas son debidas a la hidrólisis de los grupos acetil éster de la hemicelulosa, que constituye una tercera parte del total de la madera. El roble es una de las maderas que más especies ácidas emite, mientras que las maderas de álamo blanco y nogal son de las que menos emiten [6].

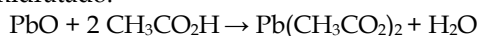
3. CORROSIÓN DEL PLOMO

Los tubos de los órganos son de plomo o de una aleación plomo-estaño [3]. El plomo presenta una buena resistencia a la corrosión atmosférica ya que en condiciones de humedad reacciona con el oxígeno ambiental formando una capa pasiva de óxido de plomo (PbO) [5, 7].

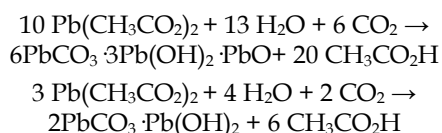


Sin embargo, la exposición continuada a los ácidos acético y fórmico produce un ciclo de corrosión en el que los iones acetato y formiato actúan como catalizadores favoreciendo la reacción de los iones plomo con el CO₂ ambiental [8, 9]. Esto explica la intensa corrosión causada por pequeñas concentraciones de ácido.

El ácido acético puede disolverse en la capa de agua de condensación que recubre el objeto y formar acetato de plomo hidratado.



Este acetato puede reaccionar con el CO₂ disuelto en el agua, formando una capa de color blanquecino, pulverulenta y de poca adhesión formada por compuestos como la plumbonacrita, la hidrocerusita y la cerusita (Tabla 1) (Fig. 4).



La transformación del acetato de plomo hidratado a hidrocerusita está muy favorecida ya es el compuesto más estable en el sistema PbO-CO₂-H₂O [10, 11]. Aún así, la

TABLA 1
PRINCIPALES PRODUCTOS DE CORROSIÓN DEL PLOMO FORMADOS EN ATMÓSFERAS DE INTERIOR [8]

Nombre	Fórmula	Color
Litargirio	$\alpha\text{-PbO}$	Rojo
Masicotita	$\beta\text{-PbO}$	Amarillo
Acetato de plomo	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$	Blanco
Plumbonacrita	$6\text{PbCO}_3 \cdot 3\text{Pb}(\text{OH})_2 \cdot \text{PbO}$	Blanco
Hidrocerusita	$2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$	Blanco
Cerusita	PbCO_3	Blanco

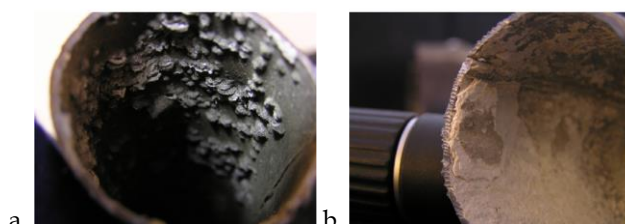


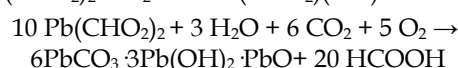
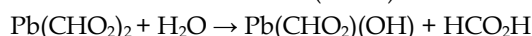
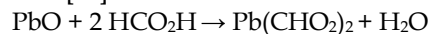
Fig. 4. Productos de corrosión en el interior del órgano Stellwagen (Lübeck, Alemania). Figuras extraídas de la referencia [3].

exposición continuada a ácido acético y CO₂ favorece la transformación de la hidrocerusita en cerusita [5].



Se ha observado una relación directa entre la concentración de ácido acético y la velocidad de corrosión del plomo [5], así como con la humedad, ya que aumenta la reactividad del ión acetato, aumentando la velocidad de degradación del plomo, especialmente cuando la humedad relativa es superior al 67 % [11].

El ácido fórmico también acelera la corrosión del plomo, aunque en menor medida que el ácido acético porque la formación de la capa de corrosión es más rápida, ralentizando la velocidad de corrosión [12]. Además, el formiato de plomo (Pb(CHO₂)₂) es menos soluble (0.016 g cm⁻³) que el acetato de plomo (0.456 g cm⁻³), por lo que la capa es más estable [12, 13]. Una exposición prolongada a este ácido induce la formación de hidroxi formiato de plomo y plumbonacrita [13].



4. MEDIDAS DE CONSERVACIÓN

De forma general, se debe mantener la temperatura y humedad del edificio relativamente baja para ralentizar la velocidad del ataque químico.

Sin embargo, la mayor complicación reside en que el principal agente de alteración de los tubos metálicos es emanado por la misma estructura del órgano. Por tanto, las medidas de conservación requieren un mayor control de las condiciones microclimáticas en el interior del instrumento. Para evitar una acumulación de las especies ácidas se recomienda ventilar el interior del órgano cada

cierto tiempo, así como utilizar sensores selectivos de las especies ácidas para evaluar su concentración.

5. CONCLUSIONES

En los últimos años, se ha producido una pérdida de la calidad del sonido de los órganos históricos de toda Europa como consecuencia de la corrosión de los tubos metálicos que los componen. Tras diversos estudios microclimáticos se constató que la corrosión era debida a la emanación de ácido acético y fórmico de la madera del propio órgano. Estos ácidos catalizan la corrosión del plomo de los tubos. Las medidas de conservación preventiva deben contemplar medidas de ventilación del interior de los órganos para minimizar el daño provocado por la acumulación de las especies ácidas.

REFERENCIAS

- [1] B. Baretzky, M. Friesel, B. Straumal, "Reconstruction of historical alloys for pipe organs brings true Baroque music back to life", *MRS Bulletin*, vol. 32, n° 03, pp. 249-255, 2007, doi: <http://dx.doi.org/10.1557/mrs2007.30>.
- [2] P. Williams, *The organ music of J. S. Bach*. Cambridge University Press, 1985.
- [3] C. Chiavari, C. Martini, D. Prandstraller *et al.*, "Atmospheric corrosion of historical organ pipes: the influence of environment and materials", *Corrosion Science*, vol. 50, n° 9, pp. 2444-2455, 2008, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2008.06.045>.
- [4] A. Justo-Estebanz, L.K. Herrera, A. Duran *et al.*, "Analysis of the restoration of an historical organ: The case study of the Cavallé-Coll organ of La Merced Church in Burgos, Spain", *Studies in Conservation*, vol. 57, n° 1, pp. 21-28, 2012, doi: <http://dx.doi.org/10.1179/2047058411Y.0000000001>.
- [5] A. Niklasson, L.-G. Johansson, J.-E. Svensson, "Influence of acetic acid vapor on the atmospheric corrosion of lead", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 152, n° 12, pp. B519-B525, 2005, doi: <http://dx.doi.org/10.1149/1.2084348>.
- [6] L.T. Gibson, C.M. Watt, "Acetic and formic acids emitted from wood samples and their effect on selected materials in museum environments", *Corrosion Science*, vol. 52, n° 1, pp. 172-178, 2010, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2009.08.054>.
- [7] T.E. Graedel, "Chemical mechanisms for the atmospheric corrosion of lead", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 141, n° 4, pp. 922-927, 1994, doi: <http://dx.doi.org/10.1149/1.2054858>.
- [8] L. Selwyn, *Metals and corrosion: a handbook for the conservation professional*. Canada: Canadian Conservation Institute, 2004.
- [9] V. Costa, F. Urban, "Lead and its alloys: metallurgy, deterioration and conservation", *Studies in Conservation*, vol. 50, n° sup1, pp. 48-62, 2005, doi: <http://dx.doi.org/10.1179/sic.2005.50.Supplement-1.48>.
- [10] P. Taylor, V.J. Lopata, "Stability and solubility relationships between some solids in the system PbO-CO₂-H₂O", *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 62, n° 3, pp. 395-402, 1984, doi: <http://dx.doi.org/10.1139/v84-070>.
- [11] A. Niklasson, L.-G. Johansson, J.-E. Svensson, "The influence of relative humidity and temperature on the acetic acid vapour-induced atmospheric corrosion of lead", *Corrosion Science*, vol. 50, n° 11, pp. 3031-3037, 2008, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.corsci.2008.08.009>.
- [12] A. Niklasson, L.-G. Johansson, J.-E. Svensson, "Atmospheric corrosion of lead the influence of formic acid and acetic acid vapors", *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 154, n° 11, pp. C618-C625, 2007, doi: <http://dx.doi.org/10.1149/1.2775173>.
- [13] J. Tétreault, E. Cano, M. van Bommel *et al.*, "Corrosion of copper and lead by formaldehyde, formic and acetic acid vapours", *Studies in conservation*, vol. 48, n° 4, pp. 237-250, 2003, doi: <http://dx.doi.org/10.1179/sic.2003.48.4.237>.



Teresa Palomar Sanz, doctora en Química por la Universidad Autónoma de Madrid (2013). Ha trabajado en diversos institutos y centros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Actualmente se encuentra cursando el Máster de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

La fluorescencia visible inducida por radiación Ultravioleta, apuntes para su uso e interpretación.

Llucia Bosch Rubio

Resumen— Apuntes prácticos y aplicaciones, de la técnica no destructiva basada en la fluorescencia visible inducida por radiación UV, en el estudio y diagnóstico de los bienes culturales.

Palabras Claves— Florescencia, Fluorescencia visible inducida, ultravioleta, UV, Técnica no destructiva, Fotografía.

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

1. INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta, es la propagación de energía en forma de ondas electromagnéticas a través del vacío o medio ambiental, con una longitud de onda situada en el espectro electromagnético entre los 10 y los 400nm (espectro invisible). Los compuestos que forman parte de los distintos estratos superficiales de una obra, están formados por átomos. Cuando uno foco de radiación UV, incide sobre éstos, los excita y provoca un fenómeno físico por el cual se realiza un proceso de emisión: La fluorescencia. [1]

2. FLUORESCENCIA INDUCIDA

Los átomos, tienen la tendencia a estabilizarse, colocando sus electrones en los orbitales más bajos y menos energéticos. Cuando es excitado por una radiación UV, sus electrones pasan de su estado fundamental a un estado más energético pero inestable. Este proceso se conoce como el desplazamiento de “stocks”. Al cesar la radiación, los electrones vuelven a estabilizarse y retornan a su estado fundamental de menor energía. La energía sobrante produce:

1. Una relajación no radiante: vibracional.
2. Una relajación radiante: fluorescencia o fosforescencia.

A nivel macroscópico, la relajación radiante de fluorescencia, se observaría a partir de la excitación de los compuestos, de forma inmediata. Éste fenómeno es visible por el ojo (a pesar de que la fuente de radiación UV está en el espectro invisible), debido a que la longitud de onda emitida es más larga y menos energética que la longitud de onda incidente. Éste fenómeno, conocido como luminiscencia, cesa al suprimir la excitación incidente, de forma instantánea. [2]

Un objeto incidido por radiaciones UV, puede reflejarlas o absorberlas de distinta forma, según las sustancias y materiales de los que se componen.

La fluorescencia se manifiesta pues, en el espectro visible, en forma de luz coloreada, de intensidad generalmente leve.

2.1. Indicadores luminiscentes

El espectro del UV, puede ser dividido en cuatro zonas:

1. UV de onda larga (UVA), entre los 320 y 400 nm.

2. UV de onda media (UVB), entre los 280 y 320 nm.
3. UV onda corta (UVC): de los 180 a 280 nm. De alta frecuencia.
4. UV de vacío: de los 10 a los 180 nm. Rápidamente absorbida por el aire, por lo que está solo presente en el vacío.

La zona del espectro UV más utilizada en el campo del estudio y diagnóstico del patrimonio, es el del UV de onda larga, que es también el de menor energía, (teniendo en cuenta que la longitud de onda es inversamente proporcional a la energía producida por la radiación). Es importante tener en cuenta los factores de energía de las distintas longitudes de onda, puesto que hay materiales, como los orgánicos, que son especialmente sensibles a las radiaciones del espectro UV. No todos los materiales emiten luminiscencia, pero aquellos que si la emiten, tienen patrones de comportamiento distintos ante la luz UV, por lo que permite diferenciar ciertos materiales y/o su antigüedad.

2.2. Metodología

En 1903, el físico estadounidense Robert William Wood (1868-1955), desarrolló el cristal de Wood como un filtro de luz que se utilizó en las comunicaciones nocturnas, durante la Primera Guerra Mundial. El filtro de cristal, eliminaba los componentes visibles del rayo de luz, dejando solamente la radiación invisible. Actualmente se usa como envoltorio de las lámparas de luz negras, captando la luz UV de onda larga.

Desde 1925 se tiene constancia de su uso como herramienta de análisis y diagnóstico no destructiva, aunque no existen catalogaciones de los resultados obtenidos en los distintos materiales, puesto que ello depende también de distintos factores que se combinan. Aun así, existen compendios de pigmentos [3] que dan algunas características del tipo de fluorescencia emitida.

Los medios para llevar a cabo esta técnica resultan muy accesibles, por lo que también resulta una técnica muy extendida; pero su principal ventaja, viene dada por el hecho de que, la energía liberada en forma de fluorescencia, puede apreciarse en el espectro visible según el material irradiado; por lo que es visible al ojo humano y también captable por un sistema fotográfico.

Así pues es necesario trabajar en cámara oscura, con los siguientes medios:

1. Fuente de radiación luminosa UV (Lámpara de Wood): Lámpara de vapor de mercurio a alta presión con un filtro de óxido de níquel, que elimina los rayos visibles y deja pasar los UV.
2. Equipo fotográfico: Pueden ser registrados por una óptica de vidrio normal, añadiendo un filtro de bloqueo del UV. Las fuentes no solo emiten radiaciones UV, sino también luz visible fría, que puede ser reflejada por el objeto y mezclarse con la señal más débil de la fluorescencia, por lo que se filtra la fuente de UV y se obstaculiza los UV reflejados, dejando pasar solamente las radiaciones visibles. [2] En este punto, debe tenerse en cuenta también, el uso imprescindible del trípode. Generalmente, los tiempos de exposición aumentan, puesto que a pesar de que los UV son más energéticos, los filtros hacen necesaria una exposición media de 15-30 segundos.
3. Equipo de protección: Protección de los ojos por medio de gafas con filtro de UV, en concordancia con las longitudes de onda que vayan a usarse.

La información que proporciona es de dos tipos

- Discriminatoria: por presencia o no de fluorescencia.
- Colorimétrica: por el tipo de color de la fluorescencia.

3. APLICACIONES

Su principal utilidad reside en el hecho de que esta técnica pone de manifiesto las modificaciones naturales o artificiales que haya sufrido la obra. La exposición a los UV, resulta dañina y acumulativa a largo plazo, por lo que resulta necesario establecer unos objetivos y resultados que se quieran obtener, mediante la aplicación de la técnica. Aun así, hay estudios que afirman que *“la cantidad de radiación de UV absorbida durante el tiempo de examinación usando la lámpara, es mínima”*[5].

Ésta técnica se utiliza:

1. Para el diagnóstico: Aportando datos discriminatorios de materiales e identificando las distintas intervenciones que puedan presentarse.
2. Durante el proceso de intervención: para evaluar la eficiencia de las remociones de algunos materiales.
3. Al finalizar los tratamientos: Para evaluar la homogeneidad de los acabados.

Así pues, si se proyecta un haz de rayos de UV sobre un objeto, se pone de manifiesto la fluorescencia visible de algunos materiales constitutivos, en función de la naturaleza química de estos, por lo que a continuación veremos de forma sintética, las aplicaciones en distintos materiales de los que se conforman los Bienes Culturales:

3.1. Cerámica

Técnica aplicada en etapas previas a la intervención, para la identificación de adhesivos y localizar su presencia en toda la superficie cerámica:

TABLA 1

Tipo	Patrón
Epoxidicos	Blanca amarillenta brillante
PVA	Azulado lechoso
Acetato de celulosa	Blanco lechoso
Paraloid B-72	No excitable por la luz UV
Nitrato de celulosa	Amarillo lechoso

- Técnica aplicada para la detección de líquenes y microorganismos en coordinación con la microscopia.

3.2. Piedra y hueso

Estos materiales, tienen comportamientos similares bajo la luz UV. En este caso, esta técnica aporta información sobre la antigüedad de los objetos y de intervenciones anteriores.

TABLA 2

Tipo	Patrón
cortes frescos	No emiten fluorescencia significativa
Pátina de superposición de depósitos	Blanco moteado
Huesos frescos	Blanco brillante
Huesos antiguos	Amarillento moteado

En el estudio de los huesos, la luz UV permite la observación de forma más clara y evidente de alteraciones antrópicas.

En el estudio de gemología, aporta datos sobre la identificación de gemas y la clasificación de diamantes. [6] y [7]

3.3. Metales

En general, los metales no emiten fluorescencia, pero si las resinas o ceras, especialmente las de origen natural; utilizadas para su protección y recubrimiento. También resulta una técnica representativa en la identificación de compuestos aplicados en superficie: tintas, apliques, engastes, etc.

3.4. Papel

La utilidad de esta técnica en el estudio y tratamiento de documentos se basa en :

- Permite discernir si es un documento antiguo o no.
- Permite discernir tintas, líneas de aguas, falsificaciones, adhesivos, escrituras borradas y la evaluación del sustrato del papel.
- Permite estudiar las marcas de agua, que por lo general presentan una fluorescencia azulada.
- Permite el estudio del foxing.

3.5. Textil

En el patrimonio textil, la fluorescencia visible inducida, permite discernir los elementos antiguos de los nuevos; aunque cabe decir que, un tejido antiguo lavado con un producto actual, puede darnos un patrón de fluorescencia erróneo, apareciendo un material actual. [8]

3.6. Madera

Depende de cada especie de madera, puede dar un patrón distinto. Ofrecerá un patrón de fluorescencia moteado, cuando en el

estudio de las deposiciones de pátina en corte, sea una madera antigua. También resulta una técnica fiable durante los procesos de restauración, en la observación de los acabados.

3.7. Fotografía

Esta técnica aporta datos sobre la evaluación, caracterización e identificación del estado de conservación de los materiales, pero resulta limitada en la identificación de los soportes.

3.8. Pintura

Esta es la disciplina en la que se le saca mas provecho a esta técnica no destructiva. La capacidad de emitir fluorescencia de un gran numero de sustancias, cambia con las alteraciones químicas y físicas producidas en ellas por el tiempo. Los materiales mas antiguos, han tenido mas tiempo para producir esos cambios y por ello tienen una fluorescencia distinta a los materiales nuevos. De esta manera, resulta una técnica útil para la identificación de repintes, añadidos y barnices no originales; así como retoques y restauraciones anteriores. Cuanto más envejecido está el material, mas fluorescencia, debido a que se forman estas interacciones químicas entre aglutinantes y pigmentos. Las zonas más nuevas aparecen pues, como manchas oscuras sobre lo demás, que tendrá algo de fluorescencia verde-amarillo claras.[9]

La mayoría de los materiales pictóricos compuestos por polímeros orgánicos, presentan colores de fluorescencia muy similares, resultando esta técnica poco adecuada para diferenciar los componentes pictóricos.

Otra problemática que se presenta ante el uso de esta técnica y la interpretación de sus resultados, es que los barnices también tienen fluorescencia, por o que enmascaran los colores de fluorescencia de otros materiales dispuestos en estratos inferiores.

Por otra parte, René de la Rie, en 1982, mediante la espectrometría de fluorescencia determinó que solo algunos pigmentos producían fluorescencia de considerable intensidad; por lo que la fluorescencia inducida de radiaciones de UV también es aplicable para la identificación de algunos pigmentos a partir de su fluorescencia característica: [10]

TABLA 3

Tipo	Patrón
Blanco de zinc Pigmento cadmio Rubia Tinctorum Alizarina Purpurina	Amarillo canario Fluorescencia
Laca de granza Blanco de cobre Azul cobalto y violeta Azul de manganeso Azul cielo Azul ultramarino	Rosa anaranjado Fluorescencia aglutinados con aceite de linaza
Amarillo Indiano	Amarillo oro

3.9. Morteros

En la actualidad, existen morteros patentados, que introducen

en su mezcla un componente sensible a la luz UV y por tanto susceptible de ser detectado con esta técnica. Utilizado por primera vez en los morteros de reposición de la Alhambra de Granada, también ha sido utilizado ya por restauradores de yeserías en Tetuán (Marruecos). Este recurso permite, además de discernir el mortero de reposición, del original, realizar un seguimiento a un monumento, usándolo para sellar una grieta y comprobando su evolución con el paso del tiempo. [11]

3.10. Autenticación.

Mediante esta técnica, permite el reconocimiento de la antigüedad de los materiales constitutivos.

5. CONCLUSIONES

Se trata de una técnica con amplias posibilidades de uso en materiales de distintas naturalezas, complementaria a otras técnicas de estudio y que, aporta información de forma instantánea, permite la documentación y resulta económicamente accesible.

REFERENCIAS

- [1] GOMEZ, M^a.; (2004). La restauración. Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte. Cuadernos Catedra. Madrid. pp. 169-170.
- [2] A.A.V.V. Estudios y analisis por metodos fisicos. Un espacio para lo invisible. Ciencia y Arte I. IPHE. pp. 26.
- [3] EASTAUGHT, N.; WALSH, V.; (2008) Pigment Compendium: A dictionary and Optical Microscopy of Historical Pigments. Routledge,.
- [4] MATTEINI, M.; MOLES, A.; (2001) Ciencia y Restauración. Editorial Nerea. Guipúzcoa, pp. 176.
- [5] GRANT, M.S.; The use of ultraviolet induced visible fluorescence in the examination of museum objects. Part 1. National Park Service. Conserve O Gram, N^o1, 2000. pp. 4 <http://www.nps.gov/museum/publications/conserveogram/01-09.pdf> (consultado el 17/02/2016).
- [6] A.A.V.V., Ionoluminiscencia: aplicaciones en bienes culturales. Ciencia y Arte I. IPHE pp. 58
- [7] A.A.V.V.; Identificación de gemas. Ciencia y Arte I. IPHE. pp. 211.
- [8] A.A.V.V. La ciencia y el Arte III. Estudio interdisciplinar del IPCE aplicado a tejidos del Valle del Nilo procedentes del Museo de la Abadía de Montserrat. Ministerio de Educación, cultura y deporte. Madrid, pp. 230-267
- [9] ALBA, L.; GONZÁLEZ, A.; (2005) Uso de la luz ultravioleta para el estudio del estado de conservación de la pintura al caballete. Actas del II congreso de GEIIC. pp.12
- [10] ESPINOSA, F.; RIVAS, V.; (2011) Fluorescencia visible inducida por radiación UV. Sus usos en conservación y diagnóstico. Una revisión crítica. Conserva, n^o 16. pp27- 38.
- [11] <http://petrobim.com/2015/12/16/la-alhambra-patenta-un-mortero-fluorescente-para-percibir-los-arreglos-en-arquitectura/> (consultada el 03/03/2016)



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.

El uso de nanopartículas de hidróxido de calcio para la consolidación de hueso y hueso fósil

Joan Escudé González

Resumen—Tomando como base los trabajos de investigadores de la Universidad de Florencia, se hace un breve análisis de las aplicaciones que la técnica de consolidación con nanopartículas de hidróxido cálcico puede tener desde un punto de vista eminentemente práctico, tanto en los campos de la restauración de bienes arqueológicos y paleontológicos como en la conservación de colecciones de historia natural y de anatomía comparada.

Palabras Clave— Hueso arqueológico, Material fósil, Colecciones osteológicas, Nanopartículas de hidróxido cálcico.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales alteraciones que sufren los materiales óseos de carácter arqueológico y paleontológico es la desmineralización, que genera, a su vez, graves problemas de cohesión interna y de estabilidad estructural.

Estudios de investigadores de la Universidad de Florencia han demostrado la efectividad de los métodos de consolidación mediante nanopartículas de hidróxido cálcico que, por procesos de carbonatación al reaccionar con el CO₂ ambiental, son capaces de generar cristales de carbonato cálcico en forma de calcita y aragonito [1].

La consolidación del material óseo, fósil o subfósil, se ha basado desde mediados del siglo pasado hasta la actualidad, principalmente en el uso de resinas poliméricas en solución con disolventes orgánicos [2], [3], [4], [5], no obstante, existen algunos inconvenientes en el uso de estos productos, relacionados especialmente con su envejecimiento y con las interferencias (Fig. 1) que pueden causar en la aplicación de técnicas analíticas [6].

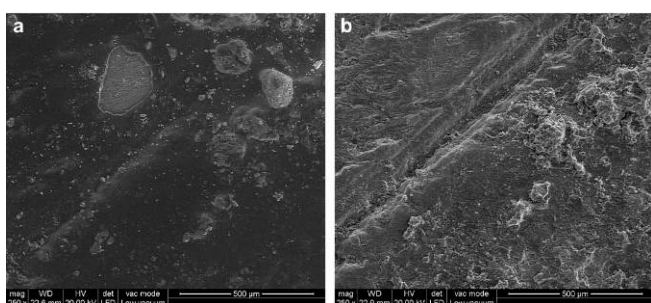


Fig. 1. Vista al microscopio electrónico de un fósil consolidado con una resina acrílica (a) y después de la eliminación de la misma (b) permitiendo la observación de marcas tafonómicas [6].

Por este motivo resulta interesante el desarrollo de una técnica de consolidación que no interfiera en las observaciones por microscopía o en los análisis de ADN que

pueda ser necesario realizar en material óseo de procedencia arqueológica.

2. PRINCIPIOS DE ACTUACIÓN

La base de la idea es simple: para hacer frente a la pérdida de las propiedades mecánicas que implica la desmineralización, lo que se propone es un proceso de remineralización, favoreciendo el crecimiento de CaCO₃ en forma de aragonito, fase menos estable que la calcita, pero con mayor resistencia mecánica. Natali *et al.* [1] consiguen el crecimiento controlado de los cristales de carbonato cálcico, por reacción entre el CO₂ atmosférico y las nanopartículas de hidróxido cálcico, en presencia del colágeno que forma parte del hueso, explotando las propiedades de esta proteína como impulsora del crecimiento de la forma polimórfica menos estable: el aragonito. Unos días después de la aplicación, la presencia de aragonito (y de calcita en menor medida) fue comprobada mediante microscopía electrónica de barrido con fluorescencia de rayos X (SEM-EDS) y espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), especialmente en las zonas del hueso de tejido esponjoso. Se realizaron también ensayos físicos y microtomografías para confirmar la mejora de las propiedades mecánicas, que se tradujo en una reducción de la porosidad y un aumento de la resistencia y la dureza hasta valores un 50-70% más altos que en huesos sin tratar.

3. CAMPOS DE APLICACIÓN

3.1. Hueso arqueológico

Los componentes principales del hueso son el colágeno, proteína fibrosa que se enrosca para formar fibrillas, y el hidroxiapatito (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), compuesto inorgánico cristalino que le confiere rigidez. Ambos constituyentes tienen un significativo contenido en agua que, tras la muerte, empieza a perderse, generando cambios en las propiedades físicas del tejido óseo. Además, ambientes ácidos de enterramiento favorecerán la desaparición del hidroxiapatito, y de modo contrario, ambientes alcalinos afectarán a la parte orgánica, al colágeno [7].

La pérdida de agua y de parte de sus componentes aumenta la fragilidad de los materiales óseos y, por tanto, a menudo la consolidación será imprescindible. Las nanopartículas de hidróxido de calcio son una opción válida para los tratamientos en laboratorio, no obstante, en caso de que estos procesos de consolidación sean necesarios en la excavación, debido a que el material esté demasiado débil como para poder ser extraído, deberemos optar por soluciones tradicionales, ya que el proceso necesario de carbonatación para que las nanopartículas sean efectivas, a menudo implica un lapso de tiempo inviable en las intervenciones *in situ*. Por otro lado, una vez extraídas las piezas y al iniciar los procesos de intervención en el laboratorio de restauración, cabe contemplar la consolidación con nanopartículas como una técnica compatible con las consolidaciones tradicionales, ya que, aunque esas piezas hayan dejado de ser aptas para cierto tipo de analíticas, el hecho de que han sido consolidadas con resinas no interferirá en la efectividad de los nanocompuestos de hidróxido cálcico como consolidantes [8].

3.2. Fósiles paleontológicos

En este caso nos encontramos ante tejidos óseos que han perdido gran parte o la totalidad del colágeno que contenían, siendo sustituido, en un proceso de mineralización, por parte de los componentes de los sedimentos de enterramiento a lo largo de miles o millones de años.

Perdemos pues la ventaja del colágeno como adyuvante del crecimiento de cristales de aragonito, sin embargo, cabe valorar en primer lugar la probable efectividad de la calcita para el proceso de consolidación y, en segundo lugar, la posibilidad de que como demostraron Gómez-Villalba *et al.* [9] los nanocristales de hidróxido cálcico pueden generar aragonito aún sin la presencia de colágeno o de otros agentes promotores. No obstante, en material subfósil, parte del colágeno aún no ha sido sustituido por los procesos de fosildiagénesis [10], punto a favor para la utilización del nanocompuesto.

A pesar de que en muchos casos la degradación de los fósiles hace imprescindible la utilización en el yacimiento de resinas de consolidación, el material fósil se ve a menudo afectado por procesos de desmineralización debidos al ataque biológico de las raíces a lo largo de su etapa de enterramiento (Fig. 2). Así pues, una técnica como ésta, basada en la consolidación por remineralización del material, puede proporcionar muy buenos resultados.



Fig. 2. Ataque biológico en un fósil de dinosaurio. Las raíces han debilitado por acción física y química la cohesión del material fósil. Fotografía: Joan Escudé

3.3. Colecciones de historia natural y de anatomía comparada

Las colecciones osteológicas cumplen un papel de gran importancia en muchos campos de la investigación científica. Estudios de carácter taxonómico, biogeográfico, ecológico, anatómico, evolutivo y genético, a menudo se sirven de la investigación con ejemplares depositados en colecciones. Por estos motivos, además de la importancia educativa y de exhibición, las colecciones de osteología (Fig. 3) constituyen un patrimonio no renovable y una fuente inagotable de información para un adecuado conocimiento de la fauna de época actual y también, por comparación, de épocas pasadas [11].



Fig. 3. Ejemplar de oveja actual tras haber sido sometido a un proceso osteotécnico de esqueletización. Fotografía: Joan Escudé

Los procesos de obtención de estos esqueletos incluyen el uso de numerosos productos químicamente agresivos como hidróxido de potasio, hipoclorito sódico, agua oxigenada, etc. Tratamientos antiguos incluso recurrían a procesos de ebullición en agua o cal viva para separar y blanquear todas las partes de los esqueletos [11].

La agresividad de estos tratamientos puede generar la descalcificación del material óseo, produciendo debilidad y erosión en las superficies y en los tejidos esponjosos. La consolidación con nanopartículas puede encontrar también en este campo, una buena opción de desarrollo.

4. CONCLUSIONES

La consolidación de hueso y hueso fósil es un tratamiento casi siempre imprescindible en los procesos de intervención de este tipo de materiales. Los productos más utilizados para tal fin son generalmente resinas acrílicas y otros polímeros, productos que pueden generar interferencias en numerosas técnicas analíticas. La consolidación con nanocompuestos de hidróxido cálcico se presenta como una alternativa químicamente compatible y de probada eficacia, basándose su principio activo en la carbonatación de las nanopartículas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para formar cristales de carbonato cálcico en sus dos morfologías minerales: calcita y aragonito, siendo esta última, menos estable pero con mejores propiedades mecánicas, la que se forma más abundantemente en presencia del colágeno de los huesos.

Son numerosas, por tanto, las aplicaciones potenciales de este método de consolidación para este tipo de materiales, pudiéndose utilizar en material óseo de procedencia arqueológica, fósiles y subfósiles de carácter paleonto-

lógico y piezas de hueso actual procedentes de colecciones de historia natural y para comparativa anatómica. Es un campo que ofrece numerosas posibilidades y en el que aún no se han realizado muchos estudios. Tampoco son abundantes los casos documentados o publicados de su uso en aplicaciones prácticas de procesos de conservación y restauración o preparación osteológica.

Por otro lado, la lentitud del proceso de carbonatación hace inviable su uso en excavación o yacimiento, donde a menudo es necesario un producto de rápida actuación y efectividad. No obstante, es una opción muy válida para determinadas piezas en laboratorio o destinadas a análisis. Además puede usarse en materiales ya consolidados con otros productos sin que se generen incompatibilidades ni interferencias en el proceso de carbonatación de las nanopartículas.

REFERENCIAS

- [1] I. Natali, P. Tempesti, E. Carretti, M. Potenza, S. Sansoni, P. Baglioni, and L. Dei, "Aragonite crystals grown on bones by reaction of CO₂ with nanostructured Ca(OH)₂ in the presence of collagen. Implications in archaeology and paleontology.," *Langmuir*, vol. 30, no. 2, pp. 660–668, Jan. 2014.
- [2] F. M. P. Howie, "Materials used for conserving fossil specimens since 1930: a review," *Studies in Conservation*, vol. 29, no. Supplement-1, pp. 92–97, Jan. 1984.
- [3] A. E. Rixon, *Fossil Animal Remains: Their Preparation and Conservation*. London: Athlone Press, 1976.
- [4] P. Leiggi and P. May, Eds., *Vertebrate Paleontological Techniques*: Cambridge University Press, 2005.
- [5] A. Aberasturi, R. Ferrer, H. Cuenca, J. Escudé, G. Gil, B. Giménez, C. Izquierdo, M. J. Jareño, and E. Moreno, "La intervención de fósiles de dinosaurio en la Escuela Taller de Restauración Paleontológica (Teruel)," *Unicum*, vol. 9, pp. 103–111, 2010.
- [6] L. López-Polín, "Possible interferences of some conservation treatments with subsequent studies on fossil bones: A conservator's overview," *Quaternary International*, vol. 275, pp. 120–127, Oct. 2012.
- [7] J. M. Cronyn, *The Elements of Archaeological Conservation*. London: Routledge, 1990.
- [8] E. Carretti, D. Chelazzi, G. Rocchigiani, P. Baglioni, G. Poggi, and L. Dei, "Interactions between nanostructured calcium hydroxide and acrylate copolymers: Implications in cultural heritage conservation," *Langmuir*, vol. 29, no. 31, pp. 9881–9890, 2013.
- [9] L. S. Gomez-Villalba, P. López-Arce, M. Alvarez de Buergo, and R. Fort, "Atomic Defects and Their Relationship to Aragonite–Calcite Transformation in Portlandite Nanocrystal Carbonation," *Crystal Growth & Design*, vol. 12, no. 10, pp. 4844–4852, Oct. 2012.
- [10] L. López-Polín, "Tratamiento de restos esqueléticos subfósiles: huesos y dientes del pleistoceno," in *Fundamental! 10: Laboratorios de paleontología*, L. Alcalá and A. Cobos, Eds. Teruel: Fundación Conjunto Paleontológico de Teruel - Dinópolis, 2007, pp. 41–43.
- [11] M. Díaz, D. a Flores, and R. M. Barquez, *Instrucciones para la preparación y conservación de mamíferos*, vol. 1. Buenos Aires: Programa de Investigaciones de Biodiversidad Argentina, 1998.



Joan Escudé González es diplomado y graduado en Conservación y Restauración de Bienes Arqueológicos por la Escuela Superior de Conservación y Restauración de Bienes Culturales de Cataluña. En activo desde el año 2008 en los campos de la arqueología, la paleontología y los bienes etnológicos, actualmente está cursando el Máster en Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico de la Universidad Pablo de Olavide.

Nuevas terapias para el tratamiento de MEN2 derivado de mutaciones en el gen RET

Cristian Díaz, Alejandro García, Ahamada Mohammed

Resumen—Las mutaciones que se producen en un oncogén que codifica para un receptor tirosina quinasa producen una serie de fenotipos que se conocen como neoplasias endocrinas múltiples de tipo 2 (MEN2), cuyo factor común consiste en un carcinoma medular del tiroides (MTC). La asociación genotipo-fenotipo en estos síndromes es muy clara y reveladora, es decir, dependiendo de las mutaciones que afecten al gen RET, vamos a poder diferenciar diferentes subtipos de la enfermedad con diferentes características.

El tratamiento actual de estos síndromes comienza una vez que se observan las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad, por lo que en este presente trabajo analizamos en qué consisten los diversos tratamientos que se llevan a cabo o están en investigación y aportamos una luz innovadora que puede abrir el camino para la futura generación de terapias eficaces antes incluso de que se desarrollen los primeros síntomas.

Palabras Clave—RET, MTC, MEN2, Docking, CRISPR/Cas9.

1. INTRODUCCIÓN

El gen RET codifica un receptor tirosina-quinasa, involucrado en varias rutas de señalización y el cual se expresa en las células neuroendocrinas, como las células C del tiroides. Se trata de un receptor asociado a la membrana cuyo ligando es el GDNF (Glial cell line Derived Neurotrophic Factor) que está caracterizado por un dominio tipo cadherina en su región extracelular, una región rica en cisteínas justo en la zona externa de la membrana y un dominio tirosina quinasa intracelular. En presencia del ligando, este receptor dimeriza dando lugar a una serie de fosforilaciones de los residuos tirosina que desencadenan toda la vía de señalización. Mutaciones en la región extracelular o transmembrana pueden hacer que estos receptores dimericen en ausencia de ligando, de manera que se dé una activación constitutiva de la vía, dando lugar a fenotipos concretos que detallaremos en los siguientes apartados. Lo mismo puede suceder por acción de mutaciones que afectan al dominio intracelular, de forma que no sea necesaria la dimerización del receptor para la activación del dominio tirosina quinasa. Basta que la mutación se produzca en un alelo para que esta vía de señalización esté alterada, precisamente porque la mutación de una de las cadenas hace que todo el complejo dimérico funcione de manera anómala (Figura 1) [1].

Estas mutaciones provocan la aparición de carcinoma medular de tiroides (MTC) que dependiendo de la mutación y, por tanto, del fenotipo desarrollado se va a clasificar en otros cuadros de cáncer familiar denominados MEN2 (Multiple Endocrine Neoplasia type 2), que son de herencia dominante porque un

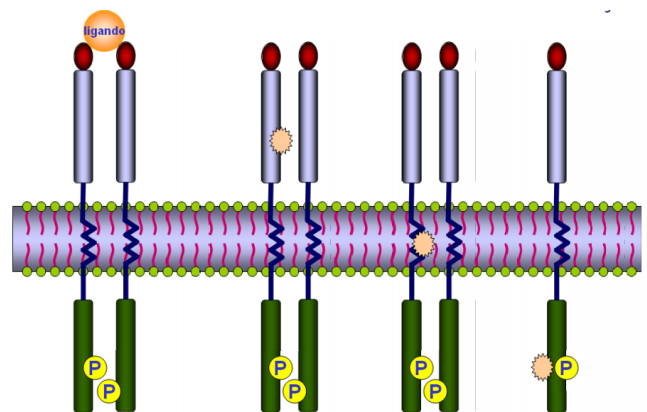


Figura 1 – Se muestra el funcionamiento normal del receptor al unirse al ligando; mutación en la región extracelular; mutación en el dominio intermembrana; y mutación en el dominio tirosina quinasa localizado en la región intracelular (respectivamente, de izquierda a derecha).

solo alelo mutado desencadena la enfermedad por un efecto dominante negativo. Por el contrario, algunas mutaciones de RET que llevan a la pérdida de función (mutaciones sin sentido, cambios del marco de lectura, deleciones, etc) provocan la ausencia de las moléculas del receptor codificadas por el alelo mutado, con el resultado de que la intensidad de la señalización de esta vía se ve disminuida. Esto provoca un déficit en la migración de precursores neurales al tubo digestivo durante el desarrollo embrionario, lo que da lugar a la Enfermedad de Hirschsprung (megacolon agangliónico: ausencia congénita de los plexos submucosos y mientérico del colon distal) [1][2].

2. FENOTIPO DE LA ENFERMEDAD

El MTC se desarrolla a partir de las células parafoliculares (o células C) del tiroides, responsables de la producción de calcitonina y constituye entre el 5 y el 8% de todos los cánceres de tiroides conocidos. Las células parafoliculares están localizadas en la lámina basal de los folículos tiroideos (aproximadamente el 1% de todas las células del tiroides) y en pacientes con MTC, la secreción de calcitonina se ve aumentada, por lo que es una de las primeras evidencias bioquímicas de esta enfermedad (Figura). Existe una progresión asociada a la edad entre la hiperplasia de las células C (CCH) inicial hasta la aparición del MTC, la cual se corresponde con la capacidad de transformación derivadas de las distintas mutaciones en RET [3][5].

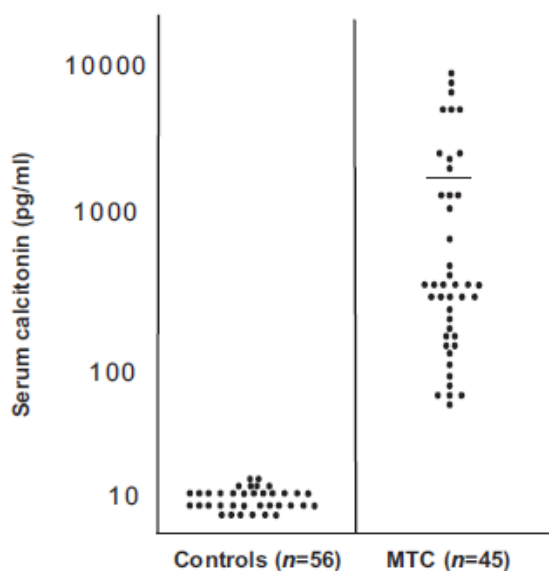


Figura 2 – Comparación de los niveles de calcitonina liberados por las células C (o parafoliculares) del tiroides entre pacientes sanos (control) y pacientes con carcinoma medular del tiroides (MTC).

Como hemos comentado y se ha venido observando tras numerosos estudios de estas enfermedades, parece haber una clara asociación genotipo-fenotipo, de modo que una mutación específica del gen RET muestra una predilección hacia un fenotipo particular y curso clínico. En base a estas correlaciones genotipo-fenotipo, las mutaciones que afectan al proto-oncogén RET se han dividido en tres niveles dependiendo del riesgo de padecer MTC en base a la mutación que poseen, siendo la mutación en el codón 634 la que se asocia con la forma de la enfermedad más agresiva. En los últimos años se ha llevado a cabo otra clasificación en función del riesgo que las clasifica en 4 categorías (ATA-A, B, C, D) [3].

La prevalencia estimada de estas enfermedades asociadas a mutaciones en este gen es de 1 por cada 30.000 en la población general. MEN2 es un

Exon	Mutation	Phenotype	ATA risk level*
5	G321R	FMTC/MEN 2A	A
8	C515S	FMTC/MEN 2A	A
	G533C	FMTC/MEN 2A	A
	532 duplication	FMTC	A
	531/9 base pair duplication	FMTC/MEN 2A	A
10	R600Q	FMTC/MEN 2A	A
	K603E	FMTC/MEN 2A	A
	Y606C	FMTC	A
	C609F/R/G/S/Y	FMTC/MEN 2A	A
	C611R/G/F/S/W/Y	FMTC/MEN 2A	B
	C618R/G/F/S/Y	FMTC/MEN 2A	B
	C620R/G/F/S/W/Y	FMTC/MEN 2A	B
11	C630R/F/S/Y	FMTC/MEN 2A	B
	D631Y	FMTC	B
	633/9 base pair duplication	FMTC/MEN 2A	B
	634/12 base pair duplication	FMTC/MEN 2A	B
	C634R	FMTC/MEN 2A	C
	C634G/F/S/W/Y	FMTC/MEN 2A	C
	635/insertion ELCR; T636P	FMTC/MEN 2A	A
	S649L	FMTC/MEN 2A	A
	K666E	FMTC/MEN 2A	A
13	E768D	FMTC/MEN 2A	A
	N776S	FMTC/MEN 2A	A
	L790F	FMTC/MEN 2A	A
	Y791F	FMTC/MEN 2A	A
14	V804L	FMTC/MEN 2A	A
	V804M	FMTC/MEN 2A	A
	V804M+E805K	MEN 2B	D
	V804M+Y806C	MEN 2B	D
	G819K	FMTC	A
	R833C	FMTC	A
	R844Q	FMTC	A
15	R866W	FMTC/MEN 2A	A
	A883F	MEN 2B	D
	S891A	FMTC/MEN 2A	A
16	R912P	FMTC/MEN 2A	A
	M918T	MEN 2B	D
13/14	V804M+V778I	FMTC/MEN 2A	B
14/15	V804M+S904C	MEN 2B/MEN 2A	D

Figura 3 – Tabla que resume las principales mutaciones y el fenotipo con el que están asociadas, indicando en cada caso el nivel de riesgo en el que se encuentran según la American Thyroid Association.

síndrome que tiene diferentes variantes clínicas, cuyo factor común es el desarrollo de MTC. Los 3 subtipos establecidos de MEN2 difieren en cuanto a la incidencia, genética, edad de aparición, asociación con otras enfermedades, agresividad y pronóstico. Casi todas las mutaciones se producen en la línea germinal, de forma que se heredan, dando un patrón de enfermedad familiar. Sin embargo, también tienen lugar mutaciones somáticas, es decir, que ocurren únicamente en el tumor [4].

2.1. MEN2A

Es la forma más común de todos los síndromes MEN2, representando el 55% de los casos. Como podemos ver en la Figura 2, este síndrome no solo desarrolla MTC, sino que tiene una alta tasa de asociación con feocromocitoma (tumor poco común

de la glándula suprarrenal) e hiperplasia múltiple de la glándula del paratiroides, con una frecuencia de aparición del 50% y 25%, respectivamente. El MTC es generalmente la primera manifestación del síndrome y la edad de aparición del mismo se sitúa entre los 5 y 25 años de edad. Esto indica que las células C son más susceptibles a la activación oncogénica de RET que las células de la médula adrenal o del paratiroides [4][2].

Las mutaciones causantes de MEN2A afectan, en la mayoría de los casos, el dominio extracelular rico en cisteínas que hemos comentado anteriormente. De hecho, la mutación más común causante de este subtipo de síndrome (80%) tiene lugar en el codón 634 del exón 11, afectando a esta región rica en cisteínas. En la mitad de los casos de mutación en 634 se trata de una sustitución de una cisteína por una arginina (TGC a CGC).

2.2. MEN2B

Este síndrome es el que menos aparece en la población (5-10% de todos los casos de MEN2), pero el más agresivo de todos. Al igual que el MEN2A se caracteriza por el desarrollo de MTC y feocromocitoma, pero en ausencia de hiperparatiroidismo. También se caracteriza por la aparición de neuromas cutáneos, ganglioneuromas del intestino y hábitos marfánicos. Los pacientes con MEN2B suelen desarrollar la enfermedad durante el primer año de vida con una morbilidad y mortalidad mucho mayor que la correspondiente a MEN2A. En muchos casos estos pacientes no tienen una historia familiar relacionada con la enfermedad, pues hasta el 50% de los casos de este síndrome son debidos a mutaciones de novo en el gen RET de la línea germinal [2][3][5].

2.3. FMTC

Este subtipo de MEN2 es el menos agresivo, aunque cada vez está siendo diagnosticado en un número mayor de casos (35-40%). La diferencia más significativa con respecto al MEN2A es la baja incidencia de otras manifestaciones clínicas además del MTC, pero aparte de este factor, diferenciar ambos síndromes es una tarea que puede entrañar una mayor complejidad. En general, el FMTC es más benigno que MEN2A o MEN2B y algunos casos tienen una aparición muy tardía o incluso no hay manifestaciones clínicas de la enfermedad. No obstante, otros tantos casos demuestran que puede resultar en un MTC agresivo y acabar con la muerte del paciente [2][3][5].

2.4. Enfermedad de Hirschsprung

La aganglioneosis colónica congénita, o enfermedad de Hirschsprung (HD, Hirschsprung Disease), afecta a 1 de cada 5.000 nuevos nacimientos. Esta enfermedad

está asociada con mutaciones en genes específicos para la migración de las células de la cresta neural al tracto gastrointestinal durante el desarrollo embrionario temprano. Las funciones de los productos génicos que están asociados con la HD incluyen factores de transcripción que regulan la expresión génica de las células de la cresta neural y factores que participan en vías de señalización entre las células mesenquimales del intestino y las de la cresta neural. Una de las vías de señalización más importantes en este proceso es en la que interviene el GDNF y su receptor, Ret. Esta vía de señalización se necesita para la proliferación y mantenimiento de los progenitores de las porciones distales del sistema neuronal entérico. Como hemos comentado anteriormente, mutaciones en el gen RET que provoquen una pérdida de función tan solo en uno de los alelos provoca que la ruta no se desarrolle correctamente, generando las malformaciones anorectales típicas de la HD [2][6].

3. TRATAMIENTOS ACTUALES

A continuación veremos los diferentes tratamientos que se están llevando a cabo para tratar el MTC. Una de las primeras vías de tratamiento es la cirugía, antes de realizar la cirugía los pacientes con sospecha de MTC deben someterse a unas pruebas, ya sean pruebas de imagen, para definir la extensión de la enfermedad e identificar la presencia de hiperparatiroidismo, además deben someterse a una evaluación bioquímica que incluye los niveles de principalmente de calcitonina, entre otros. El primer tratamiento en ambas formas tanto la hereditaria como la esporádica es la tiroidectomía y la eliminación de todo el tejido neoplásico presente en el cuello. En los pacientes portadores del gen MEN2, y debido a la alta probabilidad de que desarrollen MTC durante su vida, estos pacientes deben de ser sometidos a una tiroidectomía profiláctica [3]. En el caso de las mutaciones MEN 2A/FMTC deben de ser sometidos antes de los 5 años de vida, sin embargo en niños con MEN 2B debe realizarse la tiroidectomía lo antes posible, preferiblemente antes del primer año de vida. En el caso en el cual no se pueda realizar la tiroidectomía es necesario recurrir a tratamiento con fármacos como pueden ser los inhibidores de tirosina quinasas [3].

3.1. Inhibidores de la tirosinquinasa

Los inhibidores de las tirosina quinasas son pequeños compuestos orgánicos que afectan a las quinasas dependiente de tirosina, normalmente pertenecientes a vías oncogénicas, compitiendo con el sitio de unión a ATP del dominio catalítico de la tirosina quinasa. La ocupación de este sitio inhibe la autofosforilación y activación de la tirosina quinasa evitando así la activación de las vías de señalización intracelular. Los TKIs pueden ser específicos para una o varias tirosinas quinasas homologas. Por lo tanto una TKI puede

tener como diana varias tirosina quinasas. Entre estas dianas se encuentran otras que jueguen un papel muy importante en el proceso tumoral como puede ser MET (receptor para el factor de crecimiento de hepatocito) importante en la tumorigénesis, el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) en concreto VEGFR-2 normalmente sobreexpresado en ambos MTC que interviene en la angiogénesis y finalmente en el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) que media en la acción de diferentes factores de crecimiento. Hay gran cantidad de fármacos que intervienen inhibiendo estos receptores como podemos ver en la figura 4, principalmente nos vamos a centrar en los cáncer de medula del tiroides o MTCs.

Drug	Pathway inhibited	Thyroid cancer	Responses
Sorafenib	RAF, RET, VEGFR	30 DTC	7 (23%) PR; 16 (53%) SD (DTC)
Sorafenib	RAF, RET, VEGFR	41 PTC	6 (15%) PR; 23 (56%) SD (PTC)
		11 FTC	No response (FTC)
		4 ATC	No response (ATC)
Sorafenib	RAF, RET, VEGFR	32 DTC	8 (25%) PR; 11 (34%) SD (DTC)
Sorafenib	RAF, RET, VEGFR	16 sporadic MTC	1 (6%) PR; 14 (88%) SD
Sorafenib	RAF, RET, VEGFR	30 advanced thyroid carcinoma	9 (30%) PR; 13 (36%) SD
Imatinib	VEGFR-2, RET	15 MTC	4 (27%) SD (MTC)
Vandetanib	VEGFR-2, EGFR, RET	30 MTC hereditary	6 (20%) PR, 16 (53%) SD (MTC)
Vandetanib	VEGFR-2, EGFR, RET	19 MTC hereditary	3 (16%) PR, 10 (53%) SD (MTC)

Figura 4 – En la tabla se muestran algunos de los inhibidores de tirosina quinasas (TKIs), sus diferentes dianas, y la tasas de respuesta.

A parte de los que aparecen en la tabla hay otros TKI como Cabozatinib (Figura 5) que actúa sobre RET, MET y VEGFR-2, este fármaco está destinado al tratamiento de pacientes adultos con MTC localmente avanzado o metastásico además de otros tipos de cáncer como puede ser el de próstata. Comparado con el placebo, cabozatinib aumenta significativamente la supervivencia, reduciendo en un 72% el riesgo de la progresión de la enfermedad o la muerte en pacientes que no se pueden someter a cirugía que están adheridos a trials en fase III. In vitro ha sido demostrado actividad inhibitoria frente RET, MET y VEGFR-2 además es capaz de frenar la proliferación de células que expresan la mutación MEN 2A y el mutante C634W de RET.

Antes de utilizar estos fármacos existe la posibilidad de testar la sensibilidad de las células in vitro de cada paciente a los diferentes TKIs incrementando así la efectividad de estos tratamientos. Los test in vitro de quimiosensibilidad son capaces de predecir la efectividad en un 60% de los casos, en cambio un test negativo de quimiosensibilidad es capaz de predecir un 90%

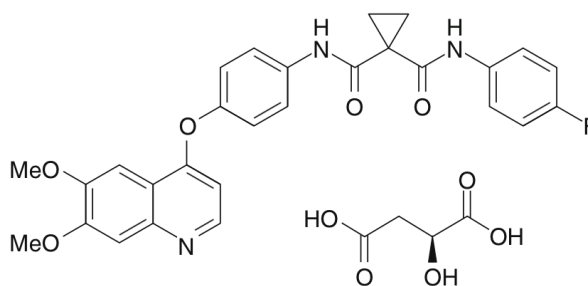


Figura 5 – Estructura de la molécula de Cabozatinib - N-(4-((6,7-Dimethoxyquinolin-4-yl)oxy)phenyl)-N'-(4-fluorophenyl)cyclopropane-1,1-dicarboxamide.

de inefectividad. Por lo tanto es muy importante ya que podemos personalizar los tratamientos con inhibidores de las tirosina quinasas [7][8][9].

Aun así es necesario buscar otras estrategias ya que el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasas tiene efectos secundarios graves y el principal problema es que a células tumorales normalmente son capaces de desarrollar estrategias para evitar los efectos de los agentes antineoplásicos y la selección de clones resistentes a la terapia son una de las razones del fallo del tratamiento. Una falta de respuesta puede ser por ejemplo, debido a que la inhibición de la diana provoca un aumento en las vías compensatorias, que provocarían un aumento del crecimiento tumoral.

4. NUEVAS TERAPIAS: CRISPR/Cas9

Se basa en dos componentes: una enzima (Cas9) y un RNA guía. Este último tiene una parte que es esencial para interactuar con la enzima y otra parte para reconocer al DNA diana. Tras producirse dicho reconocimiento, la actividad nucleasa va a romper el ADN y a través de la maquinaria de la célula se va a reparar la rotura, en un proceso en el cual se generarán indels (pequeñas inserciones y deleciones), es decir, mutaciones (Figura 8). Por lo tanto CRISPR/Cas9 se ha considerado desde sus inicios como un método para generar mutantes, aunque con el paso del tiempo y tras numerosos estudios, sus aplicaciones en el campo de la biomedicina y la edición genética han ido ampliándose notablemente. Puedes eliminar los sitios activos de la enzima y añadir represores o activadores o cualquier otro sistema que queramos dirigir a cualquier parte del genoma y silenciar, activar, medir la expresión, ver donde se expresan los genes, etc. También se puede utilizar para realizar una recombinación homóloga de alta eficiencia, al cortar el gen de interés y ser reemplazado por la secuencia que se incorpora tras el RNA guía [10][11]. Este último punto es en el que queremos hacer hincapié, pues podría ser de gran utilidad para corregir el gen RET mutado del paciente y sustituirlo

por la secuencia del gen sin mutaciones. Dado el patrón de herencia de las mutaciones que ocurren en la línea germinal, la mayoría de los casos se pueden prevenir con un diagnóstico pre-implantacional o al recién nacido. Esto nos permitiría poder corregir el gen RET en los casos que fuera necesario y evitar sufrir la enfermedad antes de que esta se inicie, sin la necesidad de extirpaciones del tiroides u otras glándulas afectadas. Es de especial hincapié el hecho de que estos diagnósticos se realicen lo antes posible, pues hemos visto que algunas de las variantes fenotípicas se desarrollan en el primer año de vida (MEN2B).

sobrevivieran. En conclusión, el uso del sistema CRISPR/Cas9 no implica modificaciones en la línea germinal (transgénesis y ESCs), se puede utilizar en células somáticas, tanto en ratones como en otros muchos modelos animales de experimentación, hacen de este sistema una clara ventaja en investigación.

Una de las partes más importantes para la aplicación de este sistema en clínica, es la necesidad de un sistema de suministro (delivery), Aun así el método anterior tiene algunos inconvenientes ya que esta relacionado con daño en el hígado y con una disrupción de la función cardiovascular. En el review realizado por Li et al. [13] podemos ver las diferentes opciones de distinta naturaleza que se usan para el suministro del sistema CRISPR/Cas9.

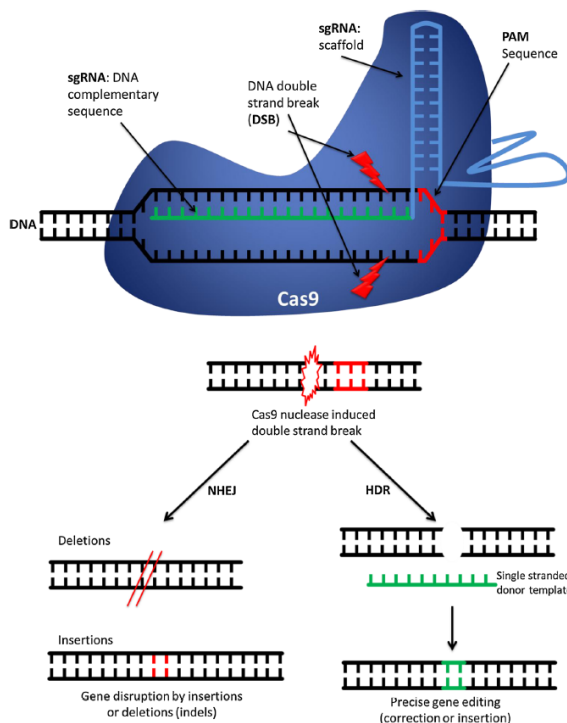


Figura 6 – Ejemplo de edición genética usando CRISPR/Cas9. La proteína Cas9 se une al ARN guía (single guide RNA, sgRNA) y en presencia de la secuencia complementaria al ADN, genera una rotura de doble cadena. Esta rotura conduce a la activación de la maquinaria celular de reparación del ADN que cataliza la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la reparación homóloga del daño (HDR).

Uno de los usos que ha tenido este sistema CRISPR/Cas9 ha sido en terapia genética somática en ratón para el tratamiento de una enfermedad metabólica hepática que implicaba una enzima del ciclo de la urea (gen OTC mutado). De tal manera que, a ratones que tenían esta mutación en el gen OTC, se les inyectó vía intravenosa el sistema (Cas9, ARN guía y el ADN donante homólogo con la secuencia corregida, no mutada), el cual fue capaz de llegar a los hepatocitos, se introdujo en ellos y sustituyó el gen mutado por el donante homólogo en un 10% de los hepatocitos, suficiente para que los ratones mutantes

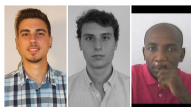
5. CONCLUSIONES

El estudio de enfermedades monogénicas cuya relación genotipo-fenotipo es tan clara como en el caso estudiado para las mutaciones en el gen RET, se hace cada vez más fundamental para el uso de nuevos tratamientos más eficaces y menos agresivos de la enfermedad. En un campo en el que la medicina personalizada está cobrando cada vez más importancia, los nuevos sistemas de edición genética aportan un factor clave que puede acercarnos cada vez más al objetivo de la misma: que cada paciente tenga un tratamiento en función de su genoma. Y esto se lleva a cabo gracias al estudio genómico de la población y de los individuos, lo cual hace indispensable el uso de la bioinformática, una herramienta que desde hace unas décadas se está imponiendo como fundamental. Eficacia, bajos costes, rapidez y seguridad, 4 factores que se hacen muy necesarios para que la biomedicina siga avanzando en el sentido correcto.

REFERENCIAS

- [1] Web del departamento de genética de la Universidad de Navarra <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema8-4.html>
- [2] Karin Frank-Raue, Susanne Rondot, Friedhelm Raue, "Molecular genetics and phenomics of RET mutations: Impact on prognosis of MTC", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2010, doi:10.1016/j.mce.2010.01.012.
- [3] F. Pacini, M.G. Castagna, C. Cipri, M. Schlumberger, "Medullary Thyroid Carcinoma", *Clinical Oncology*, 2010, doi:10.1016/j.clon.2010.05.002.
- [4] Hubner RA, Houlston RS, "Molecular advances in medullary thyroid cancer diagnosis", *Clin Chim*, 2006.
- [5] Friedhelm Raue, Karin Frank-Raue, "Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management", *Hormones*, 2009.
- [6] Erin Mundt, Michael D. Bates, "Genetics of Hirschsprung disease and anorectal malformations", *Seminars in Pediatric Surgery*, 2010, doi:10.1053/j.sempedsurg.2009.11.015.
- [7] Pinto, A., "Cabozantinib: a novel agent with a dual mechanism of action for castration-resistant prostate carcinoma", *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2014, 73(2), 219-222.
- [8] Antonelli, A., Fallahi, P., Ferrari, S. M., Mancusi, C., Colaci, M., Santarpia, L., Ferri, C., "RET TKI: potential role in thyroid cancers". *Current oncology reports*, 2012, 14(2), 97-104.

- [9] Hoy, S. M., "Cabozantinib: a review of its use in patients with medullary thyroid cancer", *Drugs*, 2014, 74(12), 1435-1444.
- [10] Andrea Pellagatti1, Hamid Dolatshad1, Simona Valletta1, Jacqueline Boulton1, "Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease", *Arch. Toxicol.*, 2015, DOI 10.1007/s00204-015-1504-y.
- [11] Ran FA, Cong L, Yan WX, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 2015;520:186-191.
- [12] Hao Yin, Daniel G. Anderson et al., "Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype", *Nat. Biotechnol.*, 2015, doi:10.1038/nbt.2884.
- [13] Li, L., He, Z. Y., Wei, X. W., Gao, G. P., Wei, Y. Q., "Challenges in CRISPR/CAS9 delivery: potential roles of nonviral vectors", *Human gene therapy*, 2015, 26(7), 452-462.



Cristian Díaz Muñoz, Alejandro García Sánchez y Ahamada Mohammed Ali actualmente son alumnos de la Universidad Pablo de Olavide, cursando el Máster en Biotecnología Sanitaria. Graduados en Bioquímica por la Universidad de Córdoba; Biología por la Universidad de Sevilla; y Bioquímica por la Universidad de Antananarivo, respectivamente.

Tratamientos actuales para la epidermodisplasia verruciforme

Irene Aizpitarte Morán y Arturo Amarilla Gudiño

Resumen—La epidermodisplasia verruciforme es una genodermatosis autosómica recesiva rara asociada con un alto riesgo de carcinoma, además de una susceptibilidad anormal a infecciones por el genotipo específico beta del virus del papiloma humano. Estudios recientes han demostrado que es causada por mutaciones en dos genes adyacentes localizados en el cromosoma 17, *EVER1/TMC6* y *EVER2/TMC8*. Estos genes codifican para proteínas transmembrana que se encuentran en el retículo endoplasmático, las cuales pueden actuar como canales de iones y/o participar en la transducción de señales. En este artículo se muestran los tratamientos actuales preventivos de esta enfermedad, pues hoy día no existe una terapia que pueda erradicarla por completo.

Palabras Claves—Epidermodisplasia verruciforme, Genes *EVER*, Tratamiento, Virus del papiloma humano, Zinc.

1. INTRODUCCIÓN

La epidermodisplasia verruciforme (EV), también conocida como síndrome de Lewandowsky-Lutz o “enfermedad del hombre árbol”, descrita por primera vez en 1922 por dos dermatólogos alemanes, Félix Lewandowsky y Wilhelm Lutz, es una genodermatosis (enfermedad de origen genético que produce manifestaciones en la piel) hereditaria, rara y universal, caracterizada por una infección crónica del virus del papiloma humano (VPH), que conlleva la aparición de lesiones cutáneas polimorfas y un riesgo elevado (30-60% de los pacientes, alrededor de los 40-50 años) de cáncer de piel, en concreto carcinoma espinocelular o de células escamosas (CCE), localizado en las zonas expuestas al sol. No obstante, en la mayoría de los casos los pacientes no llegan a padecer melanoma y la metástasis es infrecuente [1], [2].

Todo el proceso cancerígeno que produce el VPH en los queratinocitos, se lleva a cabo siempre y cuando los pacientes presenten mutaciones de pérdida de función en uno de los dos genes adyacentes *EVER1/TMC6* y *EVER2/TMC8*, localizados en el brazo largo del cromosoma 17. Las mutaciones de estos genes provocan una susceptibilidad a la infección por subtipos específicos de VPH pertenecientes al género beta, principalmente VPH5 y VPH8, que son ubicuos e inofensivos para los individuos sanos [2], [3].

En cuanto al diagnóstico de la EV, se basa en los hallazgos clínicos e histológicos. Una biopsia cutánea evidencia lesiones similares a verrugas planas con leve hiperqueratosis, hipergranulosis y acantosis u oscurecimiento de la epidermis. Los queratinocitos de la capa superior de la epidermis son más grandes, y presentan vacuolización perinuclear y un color pálido azul grisáceo. La infección por VPH puede detectarse igualmente efectuando una hibridación *in situ* o una inmunohistoquímica con anticuerpos anti-VPH. El diagnóstico diferencial in-

cluye el CCE, la acroqueratosis verruciforme, tinea versicolor y verrugas con otros orígenes [1], [2].

Por otro lado, se desconoce la prevalencia exacta de esta enfermedad, aunque a día de hoy se han descrito más de 200 casos, principalmente en Europa del Este, Polonia y América Latina. Suele manifestarse en la primera infancia (7,5% de los casos), infancia (61,5%) y adolescencia (22%), con la aparición progresiva de lesiones verrugosas planas hiperpigmentadas, placas irregulares de color marrón-rojizo, lesiones seborreicas y manchas similares a las de la pitiriasis versicolor en tronco, cuello, cara, antebrazos y pies (zonas expuestas al sol) [1].

En la mayoría de casos, la EV se transmite de forma autosómica recesiva, aunque se han descrito igualmente modos de transmisión ligados al sexo y autosómicos dominantes, aunque en menor medida y muy poco estudiados [1], [2].

2. GENES *EVER*

Los genes *EVER1* y *EVER2* se han detectado en líneas celulares linfoblásticas (linfocitos T CD4+ y CD8+, linfocitos B y células NK) así como en células de la piel (queratinocitos) mayoritariamente. Pertenecen a una familia de canales proteicos transmembrana (TMC), que en algunos casos como *EVER1* y *EVER2*, sus funciones biológicas aún están por determinar. Sin embargo, puede llegar a deducirse la función de *EVER1* y *EVER2* por homología con otras proteínas TMC, de tal manera que pueden actuar como canal de iones y/o en la transducción de señales [3], [4].

No obstante, sí se sabe que *EVER1* y *EVER2* forman parte de un complejo proteico en el retículo endoplasmático celular que interacciona con el transportador de zinc ZnT-1, influyendo en la localización intracelular y regulando la actividad de factores de transcripción inducidos por este metal. Este transportador ZnT-1 es responsable del flujo y resistencia a la toxicidad mediada por el zinc,

el cual es esencial para una elevada variedad de metaloenzimas y factores de transcripción. Sin embargo, las concentraciones intracelulares de este metal son extremadamente bajas y están altamente controladas, pues pequeñas fluctuaciones en sus niveles originan cambios en la transducción y actividad de factores de transcripción. Por ello, debido a la toxicidad celular que puede provocar, el zinc activa varios mecanismos de protección, como la inducción de transportadores ZnT-1, localizados principalmente de forma vesicular [3].

De tal forma que, en los queratinocitos, la acción conjunta de EVER1, EVER2 y ZnT-1 regula la distribución del zinc y modula su flujo hacia el núcleo celular. Debido a esta compartimentalización, cambios nucleares en la concentración de zinc, consecuencia de mutaciones en *EVER1* y *EVER2* haciendo que aumente la concentración intranuclear del metal, podrían influenciar de forma significativa en la función celular, pues se ha comprobado que queratinocitos con mutaciones en estos genes crecen más rápido que queratinocitos normales [3].

En cuanto al papel que desempeñan los genes *EVER* en inmunología, se sabe que la EV se caracteriza también por una deficiencia del sistema inmune al genotipo específico beta del VPH (VPH5 y VPH8 principalmente), asignada a los queratinocitos. De tal manera que, estas células epidérmicas contribuyen al sistema inmune cutáneo participando en la inflamación local y respuesta inmune mediante la secreción o respuesta a varias citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas. Por tanto, mutaciones en estos genes *EVER* podrían afectar a varios puntos de la respuesta del sistema inmune, conduciendo a la susceptibilidad y persistencia de las lesiones producidas por el VPH en la EV [2].

3. VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Son virus de ADN circular de doble cadena, pequeños, sin envoltura y cápsida icosaédrica. Muestran un tropismo estricto para los queratinocitos, los componentes mayoritarios del epitelio pluriestratificado (piel o membranas mucosas). La mayoría de los genomas de los VPHs contienen entre 8 y 10 marcos abiertos de lectura (ORFs), divididos funcionalmente en genes de expresión temprana (E) y genes de expresión tardía (L) [2].

Los ORFs E1 y E2 codifican para proteínas involucradas en la replicación del genoma viral, su segregación en la división celular de los queratinocitos y en la regulación de la transcripción viral. Las proteínas E6 y E7 interactúan con proteínas reguladoras del ciclo celular (promueven la fase S e inhiben la apoptosis del queratinocito), y E5 está implicada en el crecimiento celular. Por otro lado, los ORFs L1 y L2 codifican para la proteína mayor y menor de la cápsida, respectivamente (Figura 1) [2].

Estos VPHs no poseen las enzimas necesarias para replicar su ADN, por lo que utilizan la maquinaria del queratinocito ya diferenciado, que normalmente no se divide y no replica su ADN. Por ello, los VPHs deben inducir la síntesis del ADN celular, donde entran en juego principalmente las proteínas E6 y E7, las cuáles mantienen al

queratinocito diferenciado en un estado propicio para la replicación del genoma viral y la expresión tardía de los genes estructurales [2].

La proteína diana más importante de E7 es la proteína pRb, producto de un gen supresor tumoral. Esta proteína es uno de los principales reguladores del ciclo celular, que funciona uniéndose e inhibiendo la actividad del factor de transcripción E2F. Cuando pRb libera E2F, este activa la expresión de genes implicados en la progresión en el ciclo celular y en la síntesis de ADN. E7 se une a pRb inactivándolo, de manera que la célula entra en la fase S del ciclo celular y se activa la maquinaria de replicación del ADN, necesaria para la amplificación del genoma viral [2].

Por su parte, el producto del gen E6 se caracteriza por su capacidad de mediar la destrucción de la proteína p53 (producto de otro gen supresor tumoral, cuya función principal es la reparación del ADN dañado y la activación de la apoptosis cuando las lesiones no pueden repararse), a través de la vía proteolítica mediada por ubiquitina. De esta forma, se inhibe la apoptosis de la célula infectada, manteniéndola con vida hasta que ha generado una cantidad suficiente de progenie viral [2].

La acción conjunta de E7 (inhibiendo pRb) y E6 (degradando p53) supone una potente combinación oncogénica, pues da como resultado la proliferación descontrolada de las células o queratinocitos infectados por el virus del papiloma humano.

En relación con las proteínas EVER, se sabe que en los queratinocitos son reguladores negativos de AP-1, el cual es el principal factor de transcripción para el VPH. Por tanto, una mutación en cualquiera de los genes *EVER* podría facilitar la transcripción del genoma viral, particularmente la expresión de los genes E6 y E7, en base a AP-1 por no inhibirse. Así pues, podría suponerse que las proteínas EVER y ZnT-1 están implicadas en el control de la expresión de VPH [3].

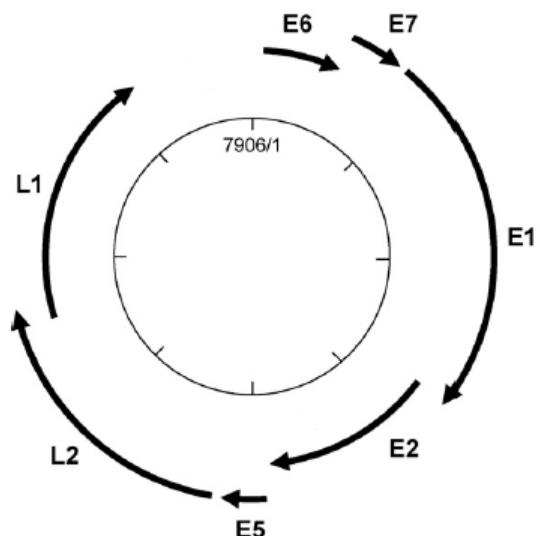


Figura 1. Organización genética del VPH. Imagen modificada de la referencia 2.

4. TRATAMIENTOS ACTUALES

Aunque hoy día la enfermedad no puede curarse totalmente, su prevención es crucial. Se conocen algunas alternativas terapéuticas para prevenir la enfermedad, tanto intervenciones no quirúrgicas como quirúrgicas.

4.1. Intervenciones no quirúrgicas

- **Pomada de imiquimod:** se usa para tratar ciertos tipos de queratosis actínicas, el carcinoma de células basales y verrugas. Es un modificador de la respuesta inmunológica, pues aumenta la actividad del sistema inmunológico del organismo induciendo citocinas y quimiocinas con efectos antivíricos e inmunomoduladores. Sin embargo, no se sabe con exactitud cómo actúa en las queratosis actínicas ni en el carcinoma de células basales [5], [6].
- **Quimioterapéutico 5-fluorouracilo:** se utiliza para tratar diversos tipos de cáncer entre los que se encuentra, al igual que en el caso anterior, el carcinoma de células basales superficiales, además de las queratosis actínicas. Su uso en estos casos dermatológicos también es tópico. Forma parte de los quimioterapéuticos anticancerosos clasificados como antimetabolitos, específicos del ciclo celular [5], [6].
- **Retinoides sistémicos:** se usan comúnmente para el tratamiento del acné y la psoriasis, además de en otras muchas enfermedades dermatológicas, tales como trastornos inflamatorios y de aumento de la renovación celular, cánceres y fotoenvejecimiento, pues son reguladores proliferación, diferenciación y apoptosis celular. También se aplican de forma tópica, aunque pueden emplearse por vía oral [5], [6].
- **Interferón alfa:** es utilizado para tratar diversas afecciones mediante inyección, como infecciones crónicas de hepatitis B y C, verrugas, melanomas, etc. Al igual que el imiquimod, es otro modificador de la respuesta inmunológica clasificado como una citoquina, moviliza el sistema inmunitario para combatir la enfermedad. De tal manera que, interfiere en la replicación de los virus en las células hospedadoras, ya que se une a receptores en la superficie de las células infectadas activando diferentes vías de señalización en las que participan diversas proteínas antivirales. También activa macrófagos y células NK e incrementa la presentación de antígenos a los linfocitos T [5], [6].
- **Terapia fotodinámica con ác. 5-aminolevulínico:** se basa en la combinación de sustancias fotosensibilizantes con la exposición a la luz para eliminar mediante fotooxidación células y/o tejidos tumo-

rales. Es decir, el ácido 5-aminolevulínico tópico (fotosensibilizante) al ser iluminado con una luz de longitud adecuada y en dosis suficiente, provoca la destrucción de las células cancerígenas. Este medicamento es utilizado también para tratar queratosis actínica [5], [6].

4.2. Intervenciones quirúrgicas

- **Crioterapia y cirugía o electrocirugía:** se utilizan como tratamientos para la eliminación de las lesiones benignas y premalignas, aunque la cirugía también está indicada para las lesiones malignas. Tras estas terapias, los pacientes suelen ser tratados con análogos de colecalciferol o vitamina D, el cual promueve la diferenciación de queratinocitos [5].
- **Injertos o autotrasplantes:** en los casos en que se necesiten injertos de piel, como por ejemplo múltiples lesiones malignas localizadas, los injertos o autotrasplantes de piel de las zonas no afectadas han dado buen resultado en la prevención de un mayor desarrollo de los cánceres [5].

5. CONCLUSIONES

Las investigaciones realizadas hasta la fecha han demostrado que la EV está causada por infecciones de VPH en aquellos pacientes que tienen mutaciones en los genes *EVER1* y *EVER2*, los cuales codifican para proteínas transmembrana que podrían actuar como canales de iones además de estar involucrados en las señales de transducción. Estos genes *EVER* se expresan en varias células linfoblásticas y en los queratinocitos.

Sin embargo, hoy día no existe un tratamiento eficaz que cure por completo la EV, tan sólo hay técnicas clínicas que ayudan a prevenirla y/o sobrellevarla. Por tanto, aún se requieren de mayor cantidad de estudios así como numerosas investigaciones científicas para poder mejorar de forma más eficaz el tratamiento de la enfermedad.

REFERENCIAS

- [1] Web de Orphanet:: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>
- [2] Gérard Orth, "Genetics of epidermodysplasia verruciformis: Insights into host defense against papillomaviruses", *Seminars in Immunology*, vol. 18, no. 6, pp. 362-374, 2006, doi: 10.1016/j.smim.2006.07.008.
- [3] M. Lazarczyk, C. Pons, J.A. Mendoza, P. Cassonnet, Y. Jacob and M. Favre, "Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses", *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 1, pp. 35-42, 2008, doi: 10.1084/jem.20071311.
- [4] K. Kurima, Y. Yang, K. Sorber and A.J. Griffith, "Characterization of the transmembrane channel-like (TMC) gene family: functional clues from hearing loss and epidermodysplasia ve-

rruciformis”, Genomics, vol. 82, no. 3, pp. 300-308, 2003, doi: 10.1016/S0888-7543(03)00154-X.

- [5] A. Zampetti, F. Giurdanella, S. Manco, D. Linder, M. Gnarra, G. Guerriero and C. Feliciani, “Acquired Epidermodysplasia Verruciformis: A Comprehensive Review and a Proposal for Treatment”, Dermatologic Surgery, vol. 39, no. 7, pp. 974-980, 2013, doi: 10.1111/dsu.12135.
- [6] Web de la Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU.: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/medlineplus.html>



Irene Aizpitarte Morán recibió el título de Graduada en Biotecnología por la Universidad del País Vasco en 2015. Actualmente es estudiante de primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.



Arturo Amarilla Gudiño recibió el título de Graduado en Biología por la Universidad de Extremadura en 2015. Actualmente es estudiante de primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Nuevos tratamientos en Diabetes Mellitus: vías alternativas a la administración de insulina

Loreto González González, Patricia Lerena Pérez

Resumen— Diabetes Mellitus es un desorden metabólico de etiología múltiple que afecta a millones de individuos a nivel mundial. A día de hoy, el principal tratamiento consiste en la administración de insulina vía subcutánea, vía de administración que presenta diversos inconvenientes, muchos de ellos debidos al propio proceso de inyección. Debido a ello, se están estudiando vías de administración alternativas como vía oral, nasal, transdérmica o pulmonar. En el presente artículo se exponen diversos sistemas de formulación en estudio para poder adecuar la insulina a la administración pulmonar, y se detallan algunas insulinas inhaladas que han conseguido llegar al mercado, como *Exubera*® y *Afrezza*®. Todo esto parece indicar que la administración de insulina inhalada vía pulmonar es una realidad cada vez más tangible para muchos diabéticos, mejorando así su calidad de vida.

Palabras Claves— Diabetes Mellitus, Insulina, Nanopartículas, Vía pulmonar.

1. INTRODUCCIÓN

Diabetes mellitus es descrita por la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) como un desorden metabólico de etiología múltiple, caracterizado por una hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, como resultado de defectos en la secreción de insulina o en la acción de la misma al no unirse correctamente a sus receptores [1]. Este desorden metabólico, independientemente de la causa por la que haya sido originado, presentará siempre una misma sintomatología: la elevación de los niveles de glucosa en sangre o hiperglucemia. En función de su causa, hay distintos tipos de diabetes [2], siendo los más comunes diabetes tipo I y diabetes tipo II, donde esta última es la más prevalente, constituyendo el 85% de los casos [3]. Entre ambas, encontramos las siguientes diferencias:

- **Diabetes tipo I:** la deficiencia de insulina es debida a la destrucción, por respuesta autoinmune, de las células productoras de insulina, situadas en los Islotes de Langerhans, en páncreas, presentando así una deficiente secreción de insulina.
- **Diabetes tipo II:** ocurre por deficiente unión de insulina a sus receptores en la superficie celular de determinados tejidos. Esto se debe a que estos receptores adquieren resistencia a unirse a insulina [2].

A fecha de 2013, había unos 382 millones de personas aproximadamente afectadas de diabetes, y se espera que en 2035, esta cifra haya aumentado a unos 592 millones aproximadamente de afectados [3].

El tratamiento de la diabetes consiste básicamente en una constante monitorización de los niveles de glucosa en sangre, con su consecuente regulación dentro de los nive-

les correctos, mediante modificación de la ingesta de carbohidratos, ejercicio físico, y administración de insulina vía subcutánea [2]. La insulina es el único tratamiento para los diabéticos tipo I, y también es necesaria para muchos diabéticos tipo II, ya que aunque éstos disponen de una amplia variedad de hipoglucemiantes orales (sulfonilureas, biguanidinas, tiazolidinonas, análogos peptídicos de glugagón, análogos de amilina, inhibidores de α -glucosidasa, ...), en muchos casos estos fármacos no son suficiente, y estos pacientes requieren también de la administración de insulina vía subcutánea [1].

La insulina, a día de hoy, se administra principalmente mediante inyecciones subcutáneas, pero esta vía de administración presenta algunos inconvenientes como hipoglucemia, hiperinsulinemia periférica, lipoatrofia o lipohiperatrofia local, obesidad (por terapia intensiva), neuropatía insulínica, o presbicia insulínica. Además, la dosis habitual de insulina es de hasta 4 inyecciones por día, lo cual puede ser incómodo en la rutina diaria de los pacientes, [2] dificultando también el cumplimiento terapéutico por parte de los mismos [4]. Debido a estos inconvenientes, se están estudiando otras vías de administración menos invasivas como la vía oral, bucal, pulmonar, nasal, y transdérmica. Estos sistemas de liberación no invasivos deben ser seguros, prácticos, discretos, rápidos y fáciles de usar. Algunos de éstos han intentado llegar al mercado, como *Oral-Lyn*® (vía bucal), *V-Go*® (vía transdérmica), *Afrezza*® y *Exubera*® (vía pulmonar), sin embargo, tampoco están exentos de inconvenientes [4].

Actualmente se busca desarrollar sistemas de liberación de insulina para inhalación, ya que los pulmones presentan como ventajas una gran área superficial absorbente para el intercambio de solutos, una membrana mucosa absorbente y delgada, y un buen riego sanguíneo. Sin embargo, la insulina no es un material susceptible de ser respirado, por lo que es necesario realizar modifica-

ciones para conseguir una formulación que sí pueda ser absorbida por los pulmones [4]. Un problema importante en la vía pulmonar para la administración de insulina es la pérdida de hasta el 90% de la misma, por ello el tratamiento es potencialmente más costoso [5].

2. SISTEMAS PARA LA ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE INSULINA QUE HAN LLEGADO A SER COMERCIALIZADOS

2.1. Exubera®

Insulina inhalada desarrollada por *Pfizer Inc's* [1]. Fue aprobada por FDA en enero de 2006 para el control de la glucemia en adultos con diabetes tipo I y II [6], y en Europa por EMA también en enero de 2006 [7], comenzando su comercialización en España en junio de 2007.

Ésta fue la primera insulina inhalada en ser comercializada [1], pero tuvo que ser retirada del mercado. Una de las causas fue por su posible vinculación con el cáncer de pulmón, ya que en 7 pacientes fue detectado. Además, sus ventas fueron escasas, y más concretamente en España, sólo a unos dos mil pacientes le fue prescrita [8]. Estas reducidas ventas seguramente se deberían a su voluminoso e incómodo inhalador (ver figura 1) y su elevado precio, ya que no siendo más efectiva que las insulinas subcutáneas, su precio era entre un 20% y un 30% superior [9].



Fig. 1. Detalle del inhalador de *Exubera*®.

2.2. Afrezza®

Insulina inhalada desarrollada por *Sanofi y MannKind Corporation* [10]. Fue aprobada por FDA en junio de 2014 para el control de la glucemia en adultos con diabetes tipo I y II [6]. Este medicamento está constituido por una insulina de acción rápida, dispuesta en un inhalador pequeño y fácil de usar, que es recargable con cartuchos de un solo uso [1].

En cuanto a su formulación, la insulina es adsorbida en micropartículas liofilizadas de bis-3,6-(4-fumarilaminobutil)-2,5-dicetopiperacina (FDKP) en condiciones ácidas suaves. FDKP es un excipiente inerte, que es absorbido pero no metabolizado, de forma que se excreta inalteradamente por vía urinaria. Estas micropartículas tienen un tamaño de unos 2.5 μm , que como se detalla más adelante, es un tamaño dentro del rango óptimo para una correcta y segura inhalación y absorción. Además, estas micropartículas presentan una alta solubilidad a pH superiores a 6, y debido a que el pH fisiológico

pulmonar está en torno a 6.5-7, estas micropartículas se disuelven fácilmente al llegar a la zona alveolar, siendo absorbidas hacia la circulación sistémica [1].

Respecto al inhalador, presenta como ventajas su pequeño tamaño que lo hace fácilmente transportable, ser reutilizable, la no necesidad de sincronización con la inhalación y la protección del polvo de insulina de la humedad ambiental. La única consideración a tener en cuenta es que los cartuchos hay que conservarlos en frigorífico, ya que deben estar a una temperatura entre 2 y 8 $^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización [1].

Sin embargo, este medicamento no está exento de inconvenientes. Está contraindicada su administración a individuos fumadores, por el posible riesgo de disminución de la función pulmonar, y a individuos con asma, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica) u otras patologías respiratorias de tipo crónico. Además, en algunos pacientes se ha registrado producción de hipoglucemia, tos, dolor de garganta e irritación [1].

3. NUEVOS SISTEMAS PARA LA ADMINISTRACIÓN PULMONAR DE INSULINA

A la hora de desarrollar la administración por esta vía, hay que tener en cuenta que para que una sustancia consiga llegar y depositarse en el espacio alveolar, su tamaño de partícula debe ser entre 1 y 3 μm , ya que partículas más pequeñas serán exhaladas, y partículas más grandes serán tragadas o retenidas en las vías respiratorias superiores. La formulación ideal consistiría en una insulina en polvo estable, con un tamaño de partícula adecuado, y con un uso limitado de excipientes [4].

3.1. Insulina pulverizada por atomización en seco (*Spray-dried*)

La atomización en seco es una técnica muy usada en la industria farmacéutica que consiste en la obtención de un polvo seco a partir de un líquido o suspensión por secado rápido con un gas caliente. Mediante esta técnica, se incluyó insulina en una formulación con ácido acético e hidróxido de amonio volátil, el cual desaparece casi por completo al realizar la atomización. Esta solución tiene un pH bajo, lo que favorece la inhibición de la agregación de las moléculas de insulina, suceso importante para garantizar la buena inspiración y absorción pulmonar de las micropartículas de insulina. Respecto a los excipientes, el ácido aspártico facilita la repulsión de zinc (Zn), lo que favorece la desintegración de los agregados de insulina, facilitando así su paso a través del epitelio pulmonar, y el acetato amónico ayuda en la inducción de formación de partículas muy pequeñas y ausentes de humedad, contribuyendo a la fácil inspiración de las mismas [11]. Se obtiene así un polvo con un tamaño de partícula adecuado, que no se deposita en garganta ni en vías respiratorias superiores [4].

Este sistema presenta como ventajas una buena capacidad de vuelo de las partículas de insulina y por tanto fácilmente transportables en la respiración, una baja capacidad de agregación de las partículas, un reducido uso de excipientes, y la no necesidad de unas condiciones espe-

ciales de almacenamiento. Sin embargo, presenta como inconvenientes la falta de estudios *in vivo*, y la ausencia de estudios que prueben esta formulación en los dispositivos para inhalación con los que sería administrada [4].

3.2. Insulina cargada en partículas de quitosano

El quitosano es un polisacárido catiónico, de estructura lineal, compuesto por β -(1,4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Ha sido usado para potenciar la absorción de moléculas hidrofílicas, como la insulina. El quitosano, es sensible a pH, de forma que al llegar a sangre, a ese pH será degradado, permitiendo la liberación de insulina [2]. Es una molécula biodegradable y biocompatible, no tóxica, y susceptible de formar nanopartículas poliméricas ramificadas, además de ser mucoadhesivo [4].

Estas nanopartículas se obtienen mediante gelificación iónica usando reticulación electrostática reversible, un método que no necesita de la utilización de disolventes orgánicos, los cuales presentan cierta toxicidad y son difíciles de eliminar [12]. Además, en este proceso de reticulación se emplea tripolifosfato pentasódico, que incrementa la cohesión entre polímero e insulina, lo que se traduce en una difusión retardada en el tiempo [4].

Estas nanopartículas presentan un buen perfil hipoglucémico. Mediante un estudio de microscopía confocal, se reveló una homogénea distribución de las mismas a lo largo del epitelio pulmonar. En ensayos *in vivo* se demostró que estas nanopartículas disminuyen la glucosa en sangre un 60% tras 1h de la administración, y el efecto hipoglucémico se mantiene hasta 240 minutos. De hecho, la reducción de la glucosa en plasma tras 1h de su administración fue similar al efecto hipoglucémico inducido por la administración subcutánea de insulina [4].

Este sistema presenta como ventajas un buen efecto hipoglucémico, ausencia de sustancias tóxicas en su estructura, capacidad de evitar a macrófagos alveolares, buenas características de mucoadhesividad y permeabilización, y una difusión retardada en el tiempo. Sin embargo, presenta inconvenientes como la necesidad de administrar altas dosis de insulina, baja biodisponibilidad y biopotencia, falta de estudios en los que se use insulina subcutánea como control comparando, y ausencia de estudios que prueben esta formulación en los dispositivos para inhalación con los que sería administrada [4].

3.3. Nanopartículas lipídicas

Estas nanopartículas formadas por lípidos en estado sólido (NLS) son submicrones, de unos 50-1000 nm de diámetro, que forman transportadores coloidales de lípidos sólidos a temperatura ambiente [2].

Su síntesis se realiza mediante el método de emulsión inversa de doble micela [13], donde los lípidos más empleados, por sus buenas propiedades, son el ácido palmítico y el ácido esteárico [2].

Se han realizado estudios comparando esta insulina inhalada con su administración subcutánea, y se observó que, tras 1h de la administración, la insulina inhalada producía un efecto hipoglucémico rápido y sostenido en el tiempo, a diferencia de la insulina subcutánea, que

producía un efecto hipoglucémico más agudo y corto, observándose un mejor perfil en la insulina inhalada [4].

Este sistema presenta como ventajas que son nanopartículas biodegradables, incrementan la biodisponibilidad de insulina, tienen un amplio tiempo de residencia en sangre, una alta tolerabilidad [2], se ha optimizado su uso en inhaladores, protegen a la insulina de su degradación, evitan que ocurra agregación de las moléculas de insulina, tienen un efecto hipoglucemiante rápido y prolongado en el tiempo, y ofrecen la posibilidad de obtener un perfil de liberación bifásico de insulina. Sin embargo, presenta inconvenientes como la unión de estas partículas al tejido pulmonar [4].

3.4. Nanopartículas con polímeros anfipáticos liofilizadas

Se han usado diferentes polímeros anfipáticos como *Solupus*®, *Pluronic*® F68, *Pluronic*® F108 y *Pluronic*® F127 para producir formulaciones de micelas liofilizadas para la inhalación de insulina [14]. Estas formulaciones también contienen ácido fenilborónico (PBA) el cual influye en la liberación *in vitro* de insulina. Se consigue un tamaño de partícula de menos de 6 micras, es decir, compatible con una buena disposición en los pulmones [9].

Las micelas liofilizadas permiten obtener una formulación pulverizada. Estos polvos para inhalación son formulaciones muy ventajosas ya que presentan una mayor estabilidad a largo plazo [14].

Tras realizarse estudios de liberación de insulina en presencia y en ausencia de glucosa, se observó que los polímeros *Pluronic*® F68, *Pluronic*® F108 mostraban una liberación de insulina más rápida que *Solupus*® y *Pluronic*® F127, que fue más sostenida en el tiempo. Así, dependiendo del polímero, se podrían emplear los primeros para una acción más inmediata o rápida y los segundos para formulaciones de liberación sostenida. De esta forma, con una adecuada mezcla de polímeros, se podrían lograr tanto efecto hipoglucémico post-prandial como de acción prolongada. Como ya se ha mencionado, el PBA permite que la liberación de la glucosa sea más rápida y no le confiere propiedades no deseadas a la formulación [14]. Numerosos estudios llegan a la conclusión de que el polímero *Pluronic*® F127 es el que presenta las características más interesantes y prometedoras para la administración pulmonar de la insulina. Aun así, deben realizarse más estudios *in vivo* en diferentes modelos animales [14].

3.5. Nanoesferas supramoleculares de ϵ -poli-L-Lisina

La formulación de estas nanopartículas esféricas consiste en el auto ensamblaje de insulina en intrananoesferas (INS) por un método de separación de fases inducido térmicamente. La superficie de la nanopartícula está funcionalizada con ϵ -poli-L-Lisina (EPL), un péptido catiónico. La nanoesfera tiene un diámetro de 150-200 nm.

La distribución pulmonar de estas nanoesferas parece adecuada, ya que después de haber realizado estudios en ratones, se observó que a los 30 minutos de su administración, las nanopartículas estaban depositadas correcta-

mente. Una vez que las nanopartículas están depositadas, éstas deben difundir entre el epitelio alveolar y el epitelio capilar. El EPL es rico en residuos de lisina y está cargado positivamente, pudiendo además transportar moléculas cargadas. El mecanismo de translocación no está claro, pero parece ser endocitosis adsorptiva desencadenada por interacciones electrostáticas de las moléculas cargadas positivamente de los péptidos y las cargadas negativamente de las proteínas de membrana [15].

El análisis farmacocinético en ratones diabéticos indicó un aumento del fármaco en sangre, es decir, la insulina llegaba al torrente sanguíneo, pudiendo ejercer su acción, con una semivida de hora y media aproximadamente, lo que indicaba una rápida absorción [15].

5. CONCLUSIONES

La obtención de sistemas de liberación de insulina vía pulmonar es laboriosa pero muy diversa, habiendo muchos estudios sobre ello. Sin embargo, para que realmente sustituya a la insulina vía subcutánea, hay que tener en cuenta otras consideraciones, como el precio, que debe ser lo suficientemente atractivo para ser sustituto de insulina subcutánea, ya que estos nuevos métodos de liberación generalmente presentan una baja biopotencia y biodisponibilidad, lo que requiere la administración de una gran cantidad de insulina, incrementándose así el coste del producto. Además, es necesaria la realización de más estudios sobre la ingeniería y el diseño de los dispositivos de inhalación.

Sin embargo, la insulina inhalada podría considerarse una realidad para muchos diabéticos insulino-dependientes, evitándose a estos pacientes los inconvenientes asociados a las formulaciones actuales subcutáneas.

Aunque se disponen de numerosos estudios sobre formulaciones para conseguir insulina inhalada, aún son necesarios más estudios, tanto en base a comparar la eficacia de estos nuevos tratamientos con los actuales, como en base al dispositivo inhalador. Parece así que en un futuro no muy lejano será posible tratar la diabetes mediante la administración de insulina vía pulmonar, mejorando la calidad de vida de estos pacientes.

REFERENCIAS

- [1] D. B. S. Brashier et al., "Inhaled insulin: A "puff" than a "shot" before meals," *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 6, no.3, pp. 126-129, 2015.
- [2] G. Sharma et al., "Nanoparticle based insulin delivery system: the next generation efficient therapy for Type 1 diabetes", *J. Nanobiotechnology*, vol. 13, no. 74, pp. 1-13, 2015.
- [3] N. G. Forouhi y N. J. Wareham, "Epidemiology of diabetes", *Medicine*, vol. 42, no. 12, pp. 698-702, Dec. 2014.
- [4] F. Sousa, P. Castro, P. Fonte y B. Sarmiento, "How to overcome the limitations of current insulin administration with new non-invasive delivery systems", *Ther. Deliv.*, vol. 6, no. 1, pp. 83-94, 2015.
- [5] L. Heinemann, A. Pfützner y T. Heise, "Alternative routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery," *Current Pharm. Design*, vol. 7, no. 14, pp. 1327-1351, 2001.

- [6] Web de Food and Drug Administration. Acceso en junio de 2016. Disponible en: <http://www.fda.gov/>
- [7] Web de European Medicines Agency. Acceso en junio de 2016. Disponible en: <http://www.ema.europa.eu/ema/>
- [8] Web de Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Acceso en junio de 2016. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/>
- [9] Web de Crownbio. Acceso en junio de 2016. Disponible en: <http://www.crownbio.com/fda-breathes-new-life-inhaled-insulin/>
- [10] Web de Sanofi: Nota de prensa de 05/02/2015. Acceso en junio de 2016. Disponible en: <http://www.sanofi.es/>
- [11] A. G. Balducci et al., "Pure insulin highly respirable powders for inhalation," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 51, no. 1, pp. 110-117, 2014.
- [12] S. Al-Qadi et al., "Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: in vivo evaluation of insulin-loaded formulations," *J. Control. Release*, vol. 157, no. 1, pp. 383-390, 2012.
- [13] J. Liu et al., "Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin," *Intern. J. Pharm.*, vol. 356, no.1, pp. 333-344, 2008.
- [14] F. Andrade et al., "Biological assessment of self-assembled polymeric micelles for pulmonary administration of insulin," *Nanomedicine: Nanotech., Biol. Med.*, pp. 1-35, 2015.
- [15] K. Shi, Y. Liu, L. Ke, Y. Fang, R. Yang, and F. Cui, "Epsilon-poly-L-lysine guided improving pulmonary delivery of supramolecular self-assembled insulin nanospheres," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 1441-1450, 2015.



Patricia Lerena Pérez, Graduada en Farmacia por la Universidad de Sevilla. Actualmente cursa el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide.



Loreto González González, recibió el título de Licenciada en Farmacia por la Universidad de Sevilla (US) en 2015, y alumna del Máster en Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide. Durante los años 2014/15 delegada de alumnos de la Facultad de Farmacia de la US.

Bacterias productoras de polímeros para su utilización como plásticos biodegradables

M^a Eugenia Ibáñez López

Resumen—El avance de las investigaciones científicas para desarrollar nuevas técnicas que satisfagan nuestras necesidades pero que a su vez, sean compatibles con el medio ambiente, está dando como resultado la investigación y el trabajo con bacterias que producen polímeros, como es el caso de los polihidroxicanoatos. Su utilización como plásticos sustitutos de los derivados del petróleo, al ser estos biodegradables, evita su persistencia en el medio y facilita todos los procesos de tratamiento, reciclaje etc., una vez que acaba su vida útil. De este modo se consigue una materia prima renovable y se obtienen productos degradables. Se podría decir pues, que cumple el séptimo y decimo mandamiento de la química verde.

Palabras Claves— Bacterias, Biodegradable, Plásticos-sustitutos, Polihidroxicanoatos, Renovable

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de materiales plásticos en la sociedad está a la orden del día, actualmente se consumen en torno a cuatro millones de toneladas de plásticos sólo en España [1], y debido a la mala separación que se realiza, no todos son tratados correctamente. Esto conlleva que una gran parte se acumule en el medioambiente, en parte también debido a la resistencia que presentan a la hora de poder ser degradados por microorganismos (biodegradación). La degradación puede tardar más de 500 años y en la mayoría de los casos no es completa, sino que se forman pequeñas partículas plásticas que quedan disponibles en el medio. En el caso de que el material se encuentre en el agua, además de provocar daños por ingestión o atragantamiento, se pueden acumular en el organismo (bioacumulación) y de esta forma pueden entrar en la cadena trófica (no obstante aún no se está seguro que esto pueda llegar a ocurrir). Asimismo los plásticos pueden acumular por adherencia compuestos químicos tóxicos como los derivados del fenol, que no son solubles en agua.

Los plásticos son materiales sintéticos obtenidos al tratar los átomos de carbono. Normalmente son derivados del petróleo, debido a sus propiedades, puesto que son impermeables, poseen una baja relación peso/volumen, y también son resistentes a diversos agentes físicos, químicos y biológicos. Todo esto sumado a que son de fácil producción y con un bajo coste asociado, hace que sean ampliamente usados. [2]

Estas son las razones por las que se están buscando alternativas a estos los plásticos derivados del petróleo, intentando generar plásticos degradables aunque con las mismas propiedades.

2. PLÁSTICOS BIODEGRADABLES

2.1. Bioplásticos

Se trata de un plástico producido con materias primas orgánicas renovables, con lo cual al final de sus vidas útiles se trata como residuos orgánicos, lo que facilita su gestión ya que son de fácil degradación y tiene lugar en un corto periodo de tiempo. El beneficio de este material ecológico, es que se trata de una sustancia fuerte y resistente que sirve de base para la elaboración de numerosos productos plásticos no contaminantes. La norma europea UNE 13432 especifica los requisitos y procedimientos para determinar la biodegradabilidad y compostabilidad de este material, por lo que debemos tener en consideración que no todos los plásticos biodegradables son compostables y viceversa. [6]

2.2. Polihidroxicanoatos (PHA)

Los PHA son polímeros naturales producidos por bacterias. Estos polímeros son generados como sustancias de reservas a partir de fuentes orgánicas por fermentación del azúcar o lípidos, como carbohidratos (glucosa o sacarosa) o hidrocarburos y son utilizados después bajo situaciones de estrés o carencia de algún tipo de nutriente. Con lo cual son una fuente de carbono y de energía. [2, 3, 5] Son poliésteres lineales formados por

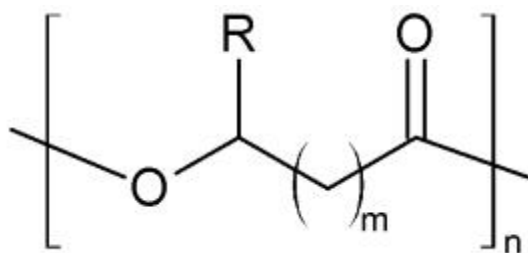
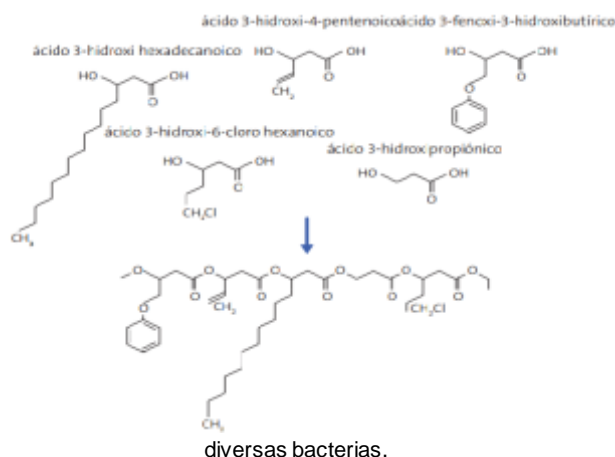


Fig. 1. Estructura PHA unidades o monómeros de hidroxiacilos polimerizados. (Figura 1). Se pueden confrontar diversos monómeros de bacterias para formar un PHA. (Figura 2)

Fig. 2. PHA hipotético formado por monómeros encontrados en



Los polihidroxialcanoatos más comunes que se pueden encontrar son: P3HB (ácido polihidroxibutírico), PLA (poliácido láctico o poliláctida), PGA (ácido poliglicólico), P3HV (poly(3-hidroxivalerato)), P(3-HHx) (poli(3-hidroxihexanoato)). Dependiendo de la longitud de la cadena carbonatada lateral (R), podemos encontrar PHA: de cadena lateral corta, *sc*-PHA, si R contiene de 1-2 átomos de carbono, de cadena lateral media, *mc*-PHA, si R contiene de 3 a 13 átomos de carbono y de cadena lateral larga, *lc*-PHA, si R comprende más de 14 átomos de carbono. [3]

En función del tipo de cadena lateral y del grupo funcional, variarán las propiedades del polímero como el punto de fusión y la cristalinidad del bioplástico, lo cual determina el tipo de proceso que se requiere para tratarlo, obtenerlo y la aplicación final que éste puede tener. [2]

2.2. Bacterias productoras de PHA

Desde que Maurice Lemoigne descubrió en 1926 que la bacteria *Bacillus megaterium* produce el PHA denominado polihidroxibutirato (PHB), [2] se han encontrado más de 300 bacterias capaces de producir PHA.

Los PHA sintetizados intracelularmente se acumulan dentro de la célula bacteriana, en grandes cantidades y en forma de gránulos (Figura 3), llegando a constituir el 90% de la biomasa. (Tabla 1). La cantidad de polímero acumulado depende de la especie, la cepa y las condiciones en las que se cultiva en el laboratorio. Condiciones de desequilibrio en el aporte de nutrientes al medio o al caldo de cultivo donde se encuentran las bacterias, provocan un aumento de la producción. Para producir PHA, son condiciones favorables aquellas en las que hay una concentración alta de fuente de carbono (que la bacteria utilizará como materia prima para sintetizar el PHA), además existen limitaciones para el

crecimiento, como los niveles de oxígeno bajos o la escasez de otros nutrientes. Por ello, cuando se da de comer en exceso a la bacteria pero de forma discontinua y desproporcionada, la bacteria, en vez de multiplicarse, “engorda” produciendo PHA de reserva. [2]

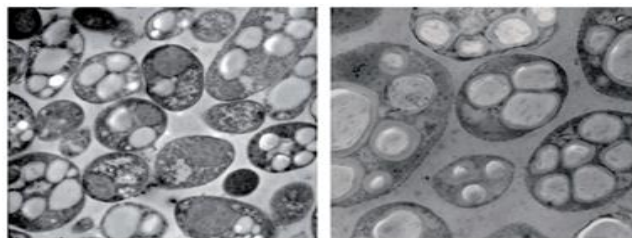


Fig. 3. Izquierda: gránulos de PHB (color claro) en cepa no mutante de la bacteria *Azotobacter vinelandii*. Derecha: cepa mutante de la misma bacteria. Se produce más PHB (gránulos más grandes), provocando que las bacterias aumenten de tamaño.

La producción de estos polímeros no se limita a un solo tipo de bacteria, sino que bacterias tanto Gram- como Gram+, pertenecientes a diversos géneros y especies son capaces de producirlos.

2.3. Degradación de los PHA

Ésta es una de las grandes ventajas y el punto fuerte de los PHA, ya que pueden ser degradados por microorganismos. Al igual que son producidos por bacterias, hay microorganismos que poseen técnicas especiales necesarias para poder degradarlos. Dado que las bacterias los producen como sustancias de reserva deben poder utilizarlos y para ello deben

TABLA 1
ALGUNAS DE LAS BACTERIAS MÁS IMPORTANTES
PRODUCTORAS DE PHA

Bacterias que acumulan PHA	
Bacteria	% de peso seco
<i>Ralstonia eutropha</i>	96
<i>Rhodobacter</i>	80
<i>Azospirillum</i>	75
<i>Azotobacter</i>	73
<i>Methylocystis</i>	70
<i>Leptothrix</i>	67
<i>Pseudomonas</i>	67
<i>Baggiatoa</i>	57
<i>Rhizobium</i>	57

Fuente: <http://www.biopolymer.net>

descomponerlos. Esto ocurre gracias a una enzima llamada *depolimerasa* que rompe el polímero obteniendo monómeros (hidroxialcanoatos). Estas moléculas de bajo

peso molecular si pueden ser fácilmente asimiladas, no solo por estos organismos específicos, sino también por otro gran número de organismos que son capaces de degradar moléculas más simples. [5]

Los microorganismos capaces de realizar este proceso son bacterias (Gram-, Gram+, actinobacterias), levaduras y hongos, los cuales se pueden encontrar en cualquier lugar, en el suelo o en el agua, y no necesitan un requerimiento específico, con lo cual, garantizando su presencia, se garantiza que se produzca la biodegradación. [2]

3. MODIFICACIÓN DE BACTERIAS

Al igual que la biodegradación es el gran punto fuerte de los PHA, el mayor inconveniente es que desde el punto de vista meramente económico a día de hoy no es competitivo. Esto ha incentivado la investigación en distintos ámbitos tanto de producción como de síntesis, para lograr abaratar costes.

La modificación genética de cepas bacterianas es una de las alternativas estudiadas para hacerlos más competitivos. Los genes que contienen la información genética para la producción de PHA fueron aislados de *Wautersia eutropha* en 1988. Esos genes se han introducido en otras bacterias que no producen PHA, como *Escherichia coli*, volviéndolas productoras. [2]

Generalmente las bacterias productoras de PHA necesitan temperaturas relativamente bajas para crecer, su tiempo de generación es normalmente largo, es difícil romper la membrana celular (lisar) y poseen las enzimas necesarias para degradar el polímero acumulado. Es por esto que se utiliza *Escherichia coli* para producir PHA indirectamente. *E. coli* ha sido ampliamente estudiada y se conoce bastante bien, crece rápido, es fácil de lisar y manejar en el laboratorio y no puede degradar PHA. Por ello se han introducido los genes PHA de varias especies bacterianas y los genes necesarios para la síntesis de PHB de *Azotobacter* (phaB, phaA y phaC) en *E. coli*, obteniéndose buenos rendimientos en cuanto a la producción del polímero. Asimismo, al no poseer enzimas que degraden a los PHA, permite la acumulación de polímero con un elevado peso molecular. [4]

4. PANORAMA ACTUAL

Todavía queda mucho por estudiar acerca de los PHA, los resultados obtenidos en el laboratorio abren el camino para investigar la conexión entre los factores que regulan la degradación de PHA y las redes globales de adaptabilidad bacteriana al ambiente.

Para poder desarrollar un proceso de producción de PHAs mediante fermentación utilizando microorganismos, es necesario optimizar el rendimiento y la facilidad de purificación del polímero y fundamentalmente abaratar el coste de los sustratos

utilizados para su obtención.

Existen varios procesos desarrollados para la producción de PHA por fermentación a partir de sustratos económicos: en Brasil se producen a partir de melaza de caña, y en Estados Unidos y Corea a partir de varios sustratos de origen vegetal. [4]

Sin embargo, las investigaciones actuales se centran en una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos, específicamente su capacidad para biodegradar total o parcialmente una amplia gama de compuestos. [7] La sociedad está más interesada en intentar mitigar el problema que en solucionarlo de raíz, promoviendo la eliminación del plástico convencional. Es por esto, junto con la poca competitividad actual de los bioplásticos que las investigaciones no disponen de financiación suficiente que permita realizar avances sustanciales en este terreno.

5. CONCLUSIONES

Los plásticos derivados del petróleo, aunque son baratos de obtener, repercuten seriamente en el medioambiente.

Por ello la reciente línea de investigación que gira en torno a los plásticos degradables debería ser una clara alternativa aunque actualmente se encuentre estancada. El coste de producción de los bioplásticos no es competitivo si se compara con los plásticos convencionales, pero se debería aprovechar la gran oportunidad que brindan los microorganismos al generar estos polímeros, ya sea mejorando las técnicas para sintetizarlos o modificando las cepas de bacterias productoras e incluso insertando los genes necesarios para la producción en otras bacterias, aportando un claro beneficio a la hora de obtener el polímero.

Si se abren nuevas líneas de investigación o se incrementan los esfuerzos en este campo, se logrará un abaratamiento de los costes, informando a las personas de que existe esta alternativa, puede haber un aumento de la demanda, lo que a su vez abarata costes y promueve la investigación. El trabajo en este campo da como resultado la adquisición de información y conocimientos que suponen un beneficio no solo en la mejora de este tipo de técnicas, sino que abre las puertas para poder colaborar con otras líneas de investigación que puedan estar relacionadas.

Una investigación paralela a ésta sería el estudio de

bacterias degradadoras de hidrocarburos ya que ambas líneas de trabajo pueden complementarse, aunque una este mas encaminada a la biorremediación y tratamiento posterior y otra a una acción anterior de prevención y reducción.

Así pues se consigue de manera directa una mejora del ambiente y la calidad de vida, con todo lo que ello conlleva.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por regalarme mi primer microscopio y a mis profesores que me estimularon a adentrarme en este mundo.

REFERENCIAS

- [1] Web mundoplast: <http://www.mundoplast.com/noticia/la-produccion-plasticos-espana-crecio-19-2011/67165>
- [2] SEGURA, ESPÍN, NOGUEZ, Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables, Biotecnología V14, México 2007. Capitulo 31
- [3] Web wikipedia:
https://es.wikipedia.org/wiki/Polihidroxialcanoato#cite_note-doi-2002-1
- [4] Web:
<http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/virginia/bacterias.htm>
- [5] Guo-Qiang Chen Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. Microbiology Monographs
- [6] Web: <http://www.labioguia.com/notas/descubren-una-bacteria-clave-para-la-produccion-de-plastico-ecologico-en-bolivia>
- [7] [Oil biodegradation by microbial-plant associations]. Ivanova AA, Vetrova AA, Filonov AE, Boronin AM.



Mª Eugenia Ibáñez López miembro de la Universidad Pablo de Olavide, estudiando último curso del Grado en Ciencias Ambientales. Técnico superior en Salud Ambiental, por el Instituto Albert Einstein Sevilla.

Los movimientos ‘anti-vacunas’. ¿Un peligro para la salud mundial?

Ana Belén Díaz Méndez

Resumen—Como sabemos, la vacuna es uno de los mayores logros de la medicina, ya que permite salvar millones de vidas cada año y ha conseguido acabar con varias enfermedades, sin embargo, existen colectivos, los ‘anti-vacunas’, que argumentan que son un peligro para la humanidad, pero ¿el peligro está en las vacunas o en los anti-vacunas?

Palabras Claves— vacunas, enfermedades, sociedad, autismo, sarampión.

Las vacunas son preparaciones destinadas a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos en el organismo capaces de neutralizar patógenos extraños [1]. En cuanto a sus principales características, estas deben ser seguras y no causar muerte ni enfermedad, deben proteger a largo plazo contra enfermedades provocadas por patógenos vivos y sus efectos secundarios deben ser mínimos [2].

Las vacunas se pueden administrar por diferentes vías, aunque la más común suele ser la inyección, y existen distintos tipos de vacunas. Tenemos las vacunas atenuadas, inactivadas, de subunidades, toxoides, recombinantes y de ADN, aunque estas últimas aún se encuentran en fase experimental [3].

La primera vacuna fue diseñada por Jenner en el año 1796 y fue contra la viruela. Casi un siglo después, en el año 1885, Pasteur procede a la vacunación contra la rabia y fue aproximadamente desde finales del siglo XIX, cuando comienza el ‘boom’ de las vacunas, apareciendo vacunas contra distintos tipos de enfermedades gracias a los avances en biología [4].

Así, desde que aparecieron las vacunas, se han salvado millones de vidas y se han combatido varias enfermedades, como la viruela, además, se ha conseguido reducir la mortalidad que causan ciertas enfermedades, por ejemplo, se ha disminuido la mortalidad mundial por sarampión hasta un 74% [1]. A pesar de esto, la administración de vacunas ha sido un tema muy controvertido a lo largo de la historia, teniendo tanto defensores como enemigos. Aunque existan numerosos estudios científicos que defienden el uso de las vacunas y su seguridad, acompañados de datos tan importantes, como es la prevención de al menos 2-3 millones de muertes anuales, existen muchos colectivos, denominados coloquialmente como ‘anti-vacunas’ que están totalmente en contra de la vacunación y ofrecen distintos argumentos contra estas [3][4].

Por un lado, algunos colectivos religiosos como los Testigos de Jehová, consideran que la vacunación supone un ‘crimen contra la humanidad’, y por otro lado, existen otros colectivos que consideran que las vacunas llevan adyuvantes muy peligrosos para la salud, o que dentro de

sus efectos secundarios se encuentran el desencadenamiento de otras enfermedades, como por ejemplo el autismo. Además, se piensa que la vacunación a niños supone una privación de su libertad y que simplemente una buena higiene y alimentación puede prevenir todas las enfermedades que las vacunas han podido controlar [1][5][6]. El resultado de estos pensamientos se ha traducido en un reciente incremento de personas sin vacunar, especialmente niños, con fatales consecuencias.

Actualmente, estos movimientos anti-vacunas han provocado la reaparición de enfermedades que ya se creían erradicadas o al menos casi controladas. Como se ha comentado anteriormente, gracias a la vacunación se ha conseguido disminuir la mortalidad por sarampión un 74%, y uno de los objetivos que tenía la OMS para el pasado año 2015 era erradicar totalmente esta enfermedad, sin embargo esto no ha sido posible debido a estos colectivos [1][7]. De hecho, se podría decir que sus propósitos se han quedado bastante alejados de la realidad, y es que han resurgido brotes de la enfermedad por todo el mundo [7].

Aunque los brotes que han surgido en países como España, entre otros, han sido generalmente pequeños y no se han cobrado ninguna vida, lo cierto es que la decisión de un pequeño colectivo de no vacunar a los niños no pone en riesgo solo la vida de estos, sino que también pone en riesgo la vida de otras personas a su alrededor, especialmente de aquellas que no tienen recursos para poder vacunarse o de niños que aún no tienen la edad suficiente para ser vacunados. Un ejemplo característico fue el brote de sarampión en el año 2010 en el barrio del Albaicín, en Granada, donde se infectaron 308 personas y el foco de la infección fue un colegio en el que el porcentaje de inmunizados apenas llegaba al 60% [7] [8].

En definitiva, la decisión de una familia de no vacunar a su hijo, afecta directamente a un centenar de personas. Afortunadamente, los colectivos anti-vacunas son bastante bajos, aunque si navegamos un poco por internet podemos ver cientos de páginas y asociaciones que dan publicidad negativa a las vacunas y aportan pruebas bastante dudosas contra ellas. Un ejemplo característico es el de la publicación de un artículo de Andrew Wakefield (gran

defensor del movimiento contra la vacunación) en el año 1998, donde asegura que la vacuna triple vírica contra el sarampión, las paperas y la rubeola causaba autismo. Este estudio, publicado en *The Lancet*, resultó ser un fraude, sin embargo, esto no impidió que se frenase el movimiento contra la vacunación y cientos de familias decidieron no vacunar a sus hijos [9].

En su estudio, Wakefield apuntó que en 12 niños autistas entre 3 y 10 años, se observaron patrones de desarrollo similares justo después de administrar la vacuna, como la pérdida de habilidades cognitivas, incluido el lenguaje. Después de unos estudios, este médico concluyó que la causa del autismo presente en estos niños posiblemente se debía al exceso de neuropéptidos tóxicos con acción opiácea que podían alterar las funciones cerebrales en un estadio precoz del desarrollo [10].

Otra teoría se centró en la presencia de timerosal en la vacuna, que es una combinación de etilmercurio y tiosalicilato que se usa como preservante. Inicialmente se pensó que el mercurio podría resultar tóxico, afectando al desarrollo neurocognitivo, sin embargo, numerosos estudios llevados a cabo en niños autistas inmunizados con vacunas con y sin timerosal demostraron que no existe ninguna relación entre el timerosal y el autismo, de hecho, en California se disminuyó el uso de timerosal en vacunas durante el año 2001, y en el año 2004, se eliminó su uso por completo, y tras esto se observó que había la misma incidencia de autismo, o incluso mayor, que cuando se usaba el timerosal como preservante [10].

Una década después y varios estudios que demuestran que el autismo no es producido por ningún tipo de vacunas no ha sido suficiente para que la gente confíe en las vacunas. De hecho, aún existen familias que afirman que sus hijos han desarrollado la enfermedad justo después de una vacuna, y esto se puede justificar perfectamente, ya que las primeras evidencias de autismo suelen aparecer antes de los 30 meses de vida de los niños, y coincide aproximadamente con el calendario de vacunación [11].

CONCLUSIONES

La vacuna ha sido uno de los grandes avances en la medicina, y lo seguirá siendo, ya que es uno de los pocos instrumentos que nos puede permitir erradicar enfermedades tanto infecciosas como no infecciosas, ya que actualmente se están investigando vacunas capaces de tratar el cáncer.

Los pensamientos filosóficos o religiosos de ciertos colectivos, la falta de información y la desconfianza suponen un gran riesgo para nuestra salud. Aunque estos grupos de personas son relativamente pequeños, como ya hemos dicho anteriormente, tienen gran poder, ya que unos pocos niños no vacunados en un colegio pueden desencadenar brotes que afecten a cientos o miles de personas. Esto nos lleva a preguntarnos, ¿Qué pasaría si estos colectivos ganan fuerza? Posiblemente se desencadenarían enfer-

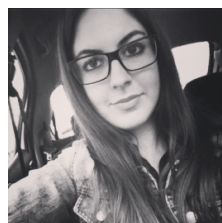
medades que no podrían ser controladas fácilmente, provocando miles de infecciones y muertes a nivel mundial, y no solo a nivel regional.

Por ello, es importante intentar concienciar a la población sobre los beneficios de las vacunas, y hablar de los peligros que puede suponer intentar vivir al margen de ellas. Por otro lado, es importante luchar para que las vacunas puedan llegar a todo el mundo, ya que hay miles de personas que, a pesar de querer ser vacunadas, no disponen de los recursos necesarios para ello y esto pone sus vidas en peligro. Esto se puede llegar a conseguir con charlas informativas en centros de salud, colegios, etc. y también gracias a los medios de comunicación.

Finalmente, pienso que es importante tomar en consideración estas palabras de Melinda Gates, esposa de Bill Gates: *"Hemos olvidado cómo se moría la gente de sarampión. Hemos olvidado aquellos azotes. Pero en África las madres conocen lo que es la muerte de sus hijos, y están dispuestas a caminar 10 kilómetros para llevarlos a que se vacunen. Tenemos una suerte increíble de tener esta tecnología. Tenemos que usarla"* [11]. Y es que, como se suele decir, no sabes lo que tienes hasta que lo pierdes.

REFERENCIAS

- [1] www.who.int
- [2] Kenneth Murphy. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science 2005. 6ª Edition.
- [3] www.vaccines.gov
- [4] www.vacunas.org
- [5] www.ajwrb.org/vaccination
- [6] www.wired.com/2009/10/ff_waronscience/all/1
- [7] www.teinteresa.es/salud/sarampion-morira-culpa-vacunados_0_1301271169.html
- [8] www.elpais.com/elpais/2015/02/04/ciencia/1423064626_198875.html
- [9] www.elpais.com/elpais/2015/06/02/planeta_futuro/1433262146_575760.html
- [10] Artigas-Pallarés J. Autismo y vacunas: ¿punto final? *Rev Neurol* 2010; 50 (Supl 3): S91-9.
- [11] <http://www.elmundo.es/salud/2015/02/08/54d609e2e2704e7f1b8b4571.html>



Ana Belén Díaz Méndez es estudiante del último curso del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla. También participa como alumna interna en el área de Biología Celular en el CABD desde el curso 2014/2015 hasta la actualidad.

Nuevas vacunas contra el virus del Ébola

Celia Martín Cuevas, Ana del Rocío Medina Bernal, Jesús Pérez López

Resumen—El virus del ébola ha demostrado ser en su última epidemia en 2014 un grave problema no sólo para las regiones subdesarrolladas donde es endémico, sino que también para la salud mundial. Por ello, ahora más que antes, se están desarrollando novedosos tratamientos, principalmente vacunas, para combatir posibles brotes y su expansión.

Palabras Claves— Ébola, virus, vacuna.

1. INTRODUCCIÓN

El ébola es un virus de la familia de los Filoviridae, del género *Ebolavirus*. El foco central reside en animales nativos de África, como los murciélagos de la fruta.

De hecho, se cree que éstos son los huéspedes naturales. Existen 5 cepas, de las que 4 afectan a humanos: *Zaire ebolavirus* (causante de la epidemia de 2014), *Sudan ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus* y *Bundibugyo ebolavirus*. El último (no afecta a humanos) es *Reston ebolavirus* [1]. Es un virus, cuya mortalidad excede el 50% y causa agudas fiebres hemorrágicas. Antes sólo existían cuidados paliativos y métodos para frenar la transmisión. [2]

Fue descubierto en 1976 en Yambuku (República Democrática del Congo) a 60 millas del río Ébola. Sin embargo, el virus permanece completamente ignorado mientras causa brotes esporádicos en los pocos desarrollados países africanos. Y no es hasta 2014 cuando la comunidad internacional se percata del grave problema para la salud mundial que supone el ébola (EBOV). Es en ese año cuando se produce una expansión sin precedentes del virus en el oeste de África (Liberia, Guinea, Sierra Leona), causando 27600 casos de infectados y más de 11200 muertes. Al mismo tiempo fue clasificado por la U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como arma biológica potencial de la categoría A. A partir de ese momento la investigación en la búsqueda de antivirales y vacunas que permitan evitar la propagación de EBOV se ve altamente incrementada. [1]

En este artículo trataremos de explicar algunas de las posibles vacunas en desarrollo.

2. CICLO DE INFECCIÓN

El genoma de EBOV codifica 8 proteínas virales: nucleoproteína (NP), VP35, VP40, glicoproteína EBOV GP (homotrimerico responsable de la unión al receptor y de la fusión a la membrana, cada monómero está formado por dos polipéptidos (GP1 y GP2) unidos por un puente disulfuro. Las dos proteínas provienen de la rotura de GP0, que es el producto de la traducción), glicoproteína soluble (sGP), VP30, VP24 y la RNA-polimerasa dependiente de ARN. [2]

Su ciclo infección puede resumirse en tres etapas:

- Ataque y entrada en la célula susceptible: mediada

por EBOV-GP.

- Endocitosis de la partícula vírica, posiblemente mediante macropinocitosis aunque podrían estar implicadas otras vías endocíticas.
- En el endosoma/lisosoma (LE/LYs), las proteasas cisteína (cathepsina B) corta EBOV-GP en un fragmento de 19kDa, este sirve como ligando para Niemann-Pick C1 (NPC1), esta es una proteína multimembrana de transporte de colesterol en LE/Lys. El dominio C de interacción es fundamental para la entrada en la célula. [2]

Las principales formas de propagación son la sangre, la saliva, vómitos, heces y otros fluidos corporales, pudiendo penetrar por heridas en la piel y por las membranas mucosas. El virus, en ningún caso se transmite antes de que aparezcan los síntomas. Los primeros aparecen a los 4-10 días tras el periodo de incubación y son fiebres, escalofríos, myalgia y malestar general, por lo que pueden ser fácilmente confundidos con otras enfermedades tales como la gripe. A los 21 días, aparecen los vómitos, dolor abdominal, diarrea, hemorragia, coagulopatía y citopenia, estos son síntomas de infección severa y posiblemente fatal.

3. ANTIVIRALES Y VACUNAS

3.1 MBX 2254 Y MBX 2270

Una de las posibles estrategias para impedir la infección consiste simplemente en bloquear la entrada del virus en la célula. Y en esto se basa MBX 2254 y 2270. Estos son dos moléculas que se encontraron mediante un ensayo de cribado de alta eficiencia en que se uso un pseudotipo de virus y un adámico de benzodiazepina como inhibidor de la entrada de EBOV. Estas moléculas bloqueaban la infección de EBOV in vitro (IC_{50} de 0.28 y de $10\mu\text{mol/L}$). [2]

Ambas actúan causando un fenotipo Niemann-Pick tipo C e inhibe la interacción EBOV-GP/NPC1. Al no haber interacción la partícula vírica no puede ser liberada del LE/LYs y, en consecuencia, no se produce la infección. La unión de las moléculas al dominio C de NPC1 además genera un cambio conformacional que hace que se bloquee el transporte de colesterol por esa proteína. Por ello, se

observa un aumento del colesterol en el interior de la célula. [2]

Las moléculas eran una sulfonamida (MBX2254) y un tioéter triazol (MBX 2270). La primera presentaba un IC₅₀ de 0.29 y la segunda, de 10. Estas diferencias vienen dadas por las propias diferencias estructurales (Fig. 1) entre ambas moléculas, que harán que presenten menor o mayor afinidad, respectivamente. [2]

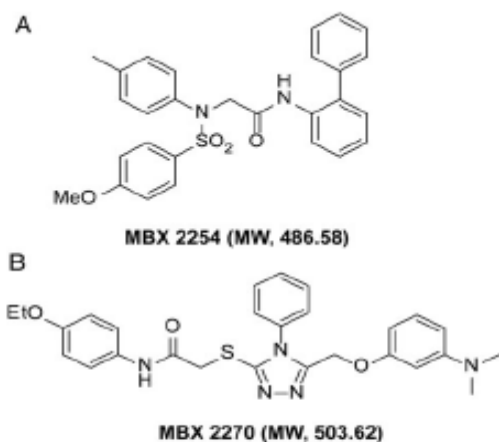


Fig. 1. Estructura química de MBX2254 (A) y MBX2270 (B).

3.2 Vacunas mediante nano-VLP

Los VLP son virus-like particles y constituyen un tipo de vacuna de segunda generación. Son proteínas víricas las cuales han sido derivadas de proteínas estructurales de un virus y tienen la capacidad de inducir inmunidad adquirida frente a un determinado virus, en este caso, el ébola. Su principal inconveniente es que son difíciles de sintetizar para virus filamentosos y de gran tamaño, como es el caso del ébola.

Para evitar este inconveniente, se han investigado nuevos métodos para sintetizar VLP para el virus del ébola. El método más efectivo consiste en un proceso de sonicación (figura 2) de las VLP, generando así nano-VLP que se purifican mediante cromatografía de membrana. Los com

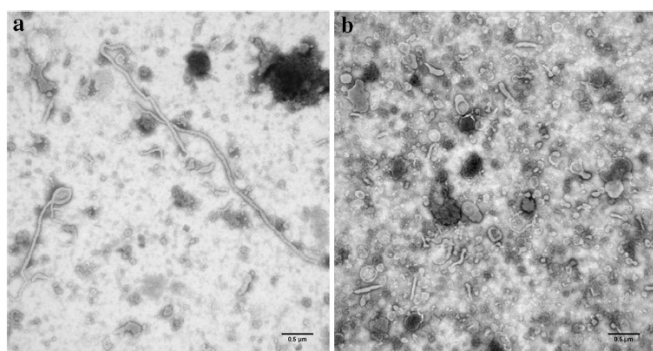


Fig. 2. Microscopía electrónica de las VLP del ébola antes de la sonicación (A) y tras la sonicación (B).

puestos resultantes son analizados mediante microscopía

electrónica y análisis de oclusión del nanoporo. También se realiza un análisis para determinar la integridad de la nueva partícula. Al ser de un tamaño menor, la vacuna tiene un tiempo de acción más rápido, son más resistentes a altas temperaturas y mantienen la estructura del VLP para el ébola en disolución. Por tanto, las nano-VLP mediante proteínas estructurales del ébola son efectivas como vacunas contra este virus. [3]

3.3 Ad5-Zaire EBOV glicoprotein

Este tipo de vacuna surgió de un estudio que pretendía sintetizar una vacuna tomando como base el virus de la estomatitis vesicular. El Ad5, serotipo 5 de adenovirus, es un adyuvante de origen humano que sirve como vector para crear una vacuna contra el ébola. Consiste en una glicoproteína que, unida al virus inactivado o muerto, otorga inmunidad frente a ese virus.

Un aspecto curioso de este tipo de vacuna es que también sirve como tratamiento post-infección en un periodo de tiempo de entre 30 minutos y 24 horas; su eficacia va disminuyendo a medida que aumenta el tiempo tras la infección. Al cabo de los 30 minutos se logró un 67% de inmunización, mientras que pasadas las 24 horas sólo se logró inmunidad en el 33% de los casos.

Por tanto, este tipo de vacuna constituye un método de inmunización rápida contra el ébola de forma pre y post-infección. Sin embargo, aún se encuentra en estudio. [4]

3.4 Vacuna bivalente para Ébola y H5N1

Este tipo de vacuna es capaz de inducir protección frente al virus del Ébola y la cepa H5N1 del virus de la Influenza a la vez, es decir, es una vacuna bivalente. Se desarrolló mediante el virus recombinante de la estomatitis vesicular, el cual expresa la hemaglutinina A/Hemos/30408/2005 H5N1 del virus de la Influenza y la glicoproteína del Ébola VSV G-HA-ZGP. Al igual que en el caso anterior, este tipo de vacuna otorga inmunidad administrada previamente a la infección frente a los dos virus, mientras que, de forma post-infección, solo genera inmunidad frente al H5N1. [5]

3.5 Vacuna VLP basada en el replicón Kunjin

Otra de las vacunas estudiadas recientemente se basa en el replicón del virus Kunjin, un virus de la familia *Flaviviridae* endémico de Oceanía. El constructo de ARN tiene delecionados genes virulentos del virus, pero conserva los que le permite replicarse. El inserto del virus del ébola es una glicoproteína con una mutación en el nucleótido 637. El experimento fue realizado en primates, concretamente en cuatro especímenes de cercopiteco verde (*Cercopithecus aethiops*), cuyo hábitat es el África subsahariana. La vacuna fue administrada por vía subcutánea en dos dosis con 4 semanas de diferencia. Los resultados fueron prometedores ya que 3 de los 4 primates sobrevivieron al virus del ébola (la infección se realizó 3 semanas después de la segunda vacunación) y no presentaron títulos del virus en sérum en los días siguientes a la infección. El cuarto espécimen, al

igual que el control negativo, murió por la infección y presentó muestras del virus en su sérum (Fig. 3). [6]

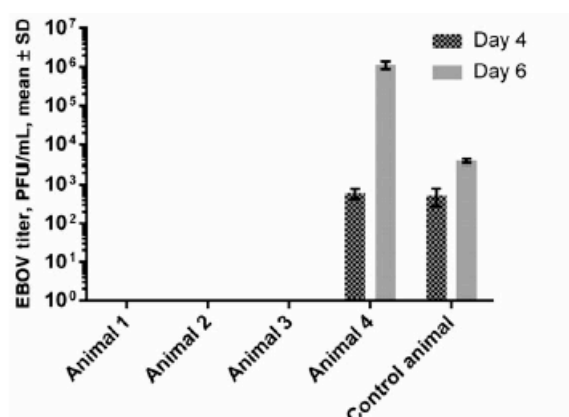


Fig. 3. Títulos de Ébola detectados en sérum para los días 4 y 6 tras la infección

REFERENCIAS

- [1] Claire Sykes and Miriam Reisinger. *Ebola: Working Toward Treatments and Vaccines*. P&T, Vol.40, No 8, August 2015, 521 – 525.
- [2] Amab Basu, Debra M. Mills y col. *Novel Small Molecule Entry Inhibitors of Ebola Virus*. The Journal of Infectious Diseases, 2015;212 (suppl 2), 425 – 434.
- [3] John H. Carra y col. *A thermostable, chromatographically purified Ebola nano-VLP vaccine*. Journal of Translational Medicine. Bio-Med Central, Vol 13, No 228 Julio 2015.
- [4] Gary Wong y col. *Adenovirus-Vectored Vaccine provides Postexposure Protection to Ebola Virus-Infected Nonhuman Primates*. The Journal of Infectious Diseases. Vol 212, Septiembre 2015, 379-383.
- [5] Gary Wong y col. *Characterization of Bivalent Vaccine Capable of Inducing Protection against both Ebola and Cross-clade H5N1 Influenza in Mice*. The Journal of Infectious Diseases. Vol 212, Septiembre 2015, 435-442.
- [6] Oleg V. Pyankov y col. *A Kunjin Replicon Virus-like Particle Vaccine Provides Protection Against Ebola Virus Infection in Nonhuman Primates*. The Journal of Infectious Diseases. 2015;212:S368–71

Celia Martín Cuevas estudia actualmente cuarto curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. El año de comienzo de sus estudios fue durante el curso 2012-2013. Forma parte del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología celular como Alumna Interna, donde está realizando su Proyecto de fin de Grado sobre el Diseño de un sistema para el estudio de comportamientos de cooperación en ratones.

Jesús Pérez López estudia cuarto curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. El año de comienzo de sus estudios fue durante el curso 2012-2013. Realiza el Proyecto fin de Grado en el Área de Microbiología del Departamento de Biología molecular e Ingeniería bioquímica.

Ana del Rocío Medina Bernal estudia cuarto curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. El año de comienzo de sus estudios fue durante el curso 2012-2013. Realiza el Proyecto de fin de Grado en el Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología celular.



Alergias vs intolerancias alimenticias

Marta Sierra Cruz

Resumen—El sistema inmune, además de protegernos frente al ataque de microorganismos exógenos, es capaz de llevar a cabo reacciones contra sustancias de origen no patogénico llamadas alérgenos. Según lo implicados que estén los componentes humorales y celulares del sistema inmune, vamos a distinguir dos tipos de reacciones adversas a los alimentos: alergias e intolerancias. Sobre todo, son destacables la alergia a la leche de vaca en bebés y niños así como las intolerancias a la lactosa y al gluten.

Palabras Claves— anafilaxis, hipersensibilidad, inmunoglobulina E (IgE), inmunoterapia, linfocito T.

1. INTRODUCCIÓN

Queda claro que todo ser vivo necesita alimentarse para poder sobrevivir. No obstante, cada vez con más frecuencia, ciertos alimentos causan reacciones adversas en nuestro organismo debido a un anómalo funcionamiento del sistema inmunológico. En los últimos años, la incidencia de alergias alimenticias se está incrementando, especialmente en las poblaciones del primer mundo. De hecho, las estadísticas muestran que 1 de cada 20 niños menores de 5 años y 1 de cada 25 adultos son alérgicos a, al menos, un alimento. Por ello, resulta totalmente necesario conocer y caracterizar este tipo de reacciones del sistema inmune, de forma que puedan diagnosticarse, prevenirse y, en caso necesario, curarse.

2. ALERGIAS

Las alergias alimentarias son respuestas adversas frente a un alérgeno que están mediadas por el sistema inmune. Se pueden distinguir tres tipos de alergias: asociadas a la producción de IgE, no asociadas a la producción de IgE y alergias mixtas.

2.1. Alergias dependientes de IgE

Los principales alérgenos causantes de la síntesis de IgE son glicopéptidos que presentan una alta resistencia a la degradación enzimática, acídica y por calor. Destacan la leche de vaca, los cacahuetes, el marisco y los huevos.

Cuando el alérgeno penetra al interior del organismo por primera vez es reconocido por linfocitos B y células presentadoras de antígenos (APC), como los macrófagos. Así, los linfocitos B reciben la primera señal de activación y los macrófagos fagocitan el alérgeno. Ambas células presentan los péptidos antigénicos a través de sus complejos mayores de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) a los linfocitos T ayudantes (Th). Estos linfocitos se activan y activan a su vez a los linfocitos B para que produzcan IgE. A continuación, con la segunda exposición al alérgeno, la IgE producida antes por las células plasmáticas y secretada al medio extracelular se une a los receptores Fc específicos de la membrana plasmática de basófilos, células cebadas y mastocitos, los cuales liberarán todo su contenido

citoplasmático mediante un proceso conocido como *degranulación*. Los gránulos liberados contienen histamina y otras sustancias que provocan la vasodilatación y, con ello, la inflamación del tejido afectado, fenómeno conocido como *anafilaxis*. Todo este proceso de alergia está esquematizado en la Figura 1.

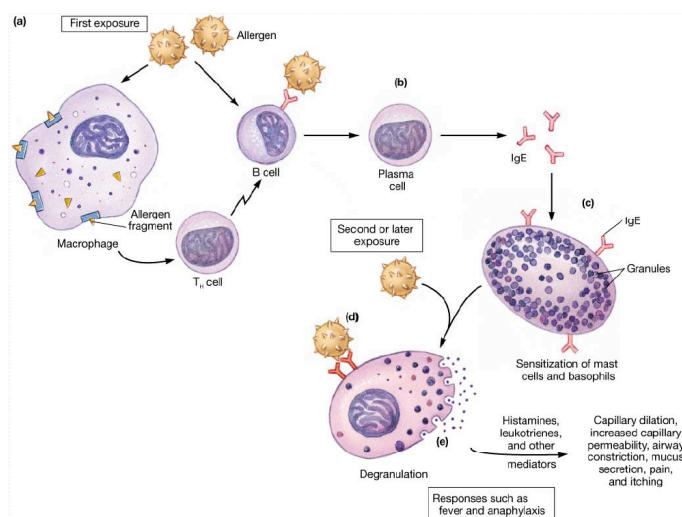


Figura 1. (a) Reconocimiento del alérgeno por parte del linfocito B y el macrófago y activación del linfocito Th. (b) Activación del linfocito B para transformarse en célula plasmática y producir IgE. (c) Unión de IgE a la membrana de mastocitos, células cebadas y basófilos. (d) Segunda exposición al alérgeno. (e) Degranulación.

Los efectos principales de la anafilaxis son: hinchazón y enrojecimiento de la piel, dificultad para respirar, inflamación del intestino, entre otros síntomas. En la Figura 2, se muestra la reacción anafiláctica a nivel tóxico. Es importante destacar que la anafilaxis no solo se produce tras la ingesta del alimento alérgeno sino también por el contacto cutáneo o por inhalación de ciertas partículas mientras se está cocinando dicho alimento. Incluso, se han dado casos de anafilaxis inducida por realizar ejercicio físico. Este fenómeno tan curioso se debe a que la histamina y otras moléculas inflamatorias que causan anafilaxis activan al receptor potencial transitorio (del inglés, Transient Receptor Potential channel, TRVP1), ya que su

umbral de activación disminuye cuando sube la temperatura o hay un exceso de acidosis metabólica, algo que ocurre cuando se realiza ejercicio físico porque se llega a producir fermentación láctica, que disminuye el pH.

Una de las alergias mediadas por IgE más comunes es el *síndrome de alergia oral* (también llamada alergia al polen alimentario), el cual viene dado por compuestos alérgenos presentes en frutas y verduras. Los síntomas son muy característicos: hinchazón exagerada de labios, lengua, párpados y garganta.



Figura 2. Niño con claros signos de enrojecimiento e hinchazón (anafilaxis) de ojos provocados por una reacción alérgica dependiente de IgE.

2.2. Alergias no mediadas por IgE

Este tipo de alergias son mucho menos comunes que las mediadas por IgE. A este grupo de alergias pertenecen tres síndromes gastrointestinales que se dan sobre todo en la infancia: *Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome (FPIES)*, *Food Protein-Induced Proctocolitis (FPIP)* y *Food Protein-Induced Enteropathies*. Aunque el mecanismo por el que se producen estas alergias es por el momento desconocido, se cree que el factor α de necrosis tumoral (TNF α) está implicado junto a la IL-13. Ambos factores promueven el daño celular en el epitelio intestinal, causando la entrada de los eosinófilos para inducir la apoptosis del tejido.

FPIES se caracteriza por una reacción dramática a la comida. Los síntomas son vómitos y, en ocasiones, diarrea. La alergia se produce contra leches de vaca, soja y arroz. Aunque los síntomas suelen desaparecer entre 6 y 12 horas después de la exposición al alérgeno, los bebés suelen presentar malestar general intenso. Por su parte, *FPIP* es un síndrome transitorio que se produce en neonatos, cuyas heces contienen sangre y mucosidad. El alérgeno principal es la leche de vaca ingerida por la madre y que pasa a través de la leche materna al recién nacido. Por este motivo, este síndrome solamente se da en bebés lactantes. Los principales síntomas son inflamación del colon y el recto. Por último, la *enteropatía* se caracteriza por provocar diarrea, esteatorrea (secreciones lipídicas en las heces) y ausencia de ganancia de peso durante los primeros meses de vida. Las leches de vaca y soja son los desencadenantes principales, aunque se han detectado reacciones parecidas

con pollo, arroz y pescado.

2.3. Alergias mixtas

En este tipo de alergias, hay mecanismos que dependen de IgE y otros que no. Destacan las *alergias a la proteína de la leche*, la *esofagitis eosinófila (EO)* y la *gastroenteritis eosinófila (EG)*.

La alergia a las lactoproteínas de la leche de vaca es muy común en recién nacidos. Se da principalmente por la degranulación de los mastocitos, basófilos y células cebadas por acción de la IgE, aunque también hay evidencia de que participan mecanismos no dependiente de la producción de anticuerpos. Puede causar anafilaxis y, en el 80% de los casos, esta alergia causa la enfermedad de reflujo gastroesofágico en bebés.

EO se caracteriza por una alta concentración de eosinófilos en el epitelio del intestino. Se asocia con episodios de asma, rinitis y eccemas. Los alérgenos principales que la causan son las leches de vaca y soja, los huevos y el trigo. Se da tanto en bebés como en adultos y los síntomas más relevantes son dolor abdominal, reflujo, vómitos, tos y dolor de pecho.

EG incluye gastritis eosinófila, enteropatía eosinófila y colitis eosinófila, en función del tejido específico donde se integren los eosinófilos (estómago, intestino delgado y colon del intestino grueso, respectivamente). Es una enfermedad severa caracterizada por dolor abdominal crónico, náuseas, vómitos y diarrea.

3. INTOLERANCIAS: LACTOSA Y GLUTEN

Las intolerancias alimentarias son reacciones adversas frente a ciertos alimentos en las que no se ve involucrado el sistema inmune. La mayor parte de estas intolerancias vienen dadas por deficiencias en ciertas enzimas metabólicas, como el caso de la intolerancia a la lactosa o a la fructosa.

Las intolerancias son mucho más frecuentes en la población que las alergias, aunque los síntomas son muy similares, por lo que tienden a confundirse. Las intolerancias alimentarias se caracterizan también por otros síntomas no presentes en las alergias como la migraña, fatiga muscular y cambios de humor.

La *intolerancia a lactosa* constituye el tipo de intolerancia alimentaria más común. Las personas que la sufren no pueden consumir ningún producto de origen lácteo, ya que presentan una deficiencia de la enzima lactasa. La lactasa se encarga de hidrolizar este disacárido en glucosa y galactosa para que puedan ser usadas por las células como sustrato del metabolismo. Debido a este déficit, la lactosa llega íntegra al tracto digestivo, donde la flora intestinal la metaboliza y forma gas. Este gas es el responsable de los principales síntomas de la intolerancia a la lactosa: hinchazón, dolor abdominal y, a veces, diarrea. Debido a que la leche es un alimento esencial para el desarrollo de los niños, no existen casos de intolerancia a lactosa en bebés ni niños menores de 5 años porque estos tienen niveles normales de lactasa.

Actualmente, existe todavía mucha controversia en el ámbito científico sobre dónde incluir la *celiaquía*. La mayoría de investigadores la consideran una intolerancia porque se produce únicamente un allanamiento del intes-

tino sin que intervenga el sistema inmune. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la intolerancia al gluten se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos. Por lo tanto, podría ser considerada también como una alergia.

El gluten es una proteína presente en cereales como el trigo, el centeno y la cebada, formada por la unión de otras dos proteínas llamadas gliadina y glutenina.

La *intolerancia al gluten* se basa en la expresión de un MHC II con los haplotipos DQ2 y/o DQ8. Estos MHC se expresan en la membrana celular de las APC del intestino y se encargan de presentar los péptidos del gluten modificados a los linfocitos Th, por lo que se pone en marcha la respuesta inmune adaptativa. El gluten es una proteína formada por la unión de otras dos: glutenina y gliadina. Es rica en residuos de glutamina y prolina, que son responsables de que el gluten no pueda ser digerido completamente en el intestino, lo que causa su aplanamiento. Al atravesar el epitelio, algunos fragmentos se ponen en contacto con una enzima llamada *transaminasa* (tTG) que, como su nombre indica, elimina los grupos amino. Esto provoca que los péptidos queden cargados muy negativamente, de forma que son reconocidos por los MHC y se presentan a los linfocitos Th. Así, los linfocitos Th se activan y provocan la activación de linfocitos Tc, la liberación de IFN γ y la inflamación. Actualmente, el mecanismo por el cual la tTG se activa es desconocido.

Asimismo, Nadal y col. (2007) y Collado y col. (2008 y 2009) [6], demostraron que la microbiota intestinal también participa en la intolerancia al gluten. Se ha visto que la población de *Bacteroides spp.* aumenta mientras que las de *Bifidobacterium spp.* y *B. longum* disminuyen en personas intolerantes al gluten en comparación con personas sanas. Además, mediante análisis serológicos, otros científicos mostraron que la intolerancia al gluten es una especie de enfermedad autoinmune, ya que los linfocitos B se activan de alguna manera todavía desconocida y terminan produciendo autoanticuerpos contra la tTG y la IgA de la mucosa intestinal.

4. CONCLUSIONES

Hasta ahora, el diagnóstico de alergias e intolerancias alimentarias se ha venido haciendo de forma simple mediante análisis de sangre para detectar Ig-E soluble, test cutáneos con alérgenos, seguimiento de la sintomatología y revisión de la historia clínica del paciente. Además, los tratamientos actuales se basan en fármacos con actividad antihistamínica, cortocoides y adrenalina así como con la eliminación estricta del alimento que causa la alergia de nuestra dieta. Sin embargo, con el avance de la tecnología y las investigaciones en el ámbito de la biotecnología alimentaria, sobre todo en nutrigenética y nutrigenómica, llegará un momento en que se pueda secuenciar el genoma de cada paciente y determinar de forma más exhaustiva la determinación genética a padecer una alergia y/o intolerancia. Así, gracias a la nutrición personalizada, los médicos serán capaces de recomendar a cada paciente las cantidades específicas de cada alimento alérgeno que pueden tomar sin necesidad de eliminarlos completamente de la dieta, siempre atendiendo a las características

genéticas del paciente. Asimismo, en la actualidad, se están probando tratamientos de alergias basados en la inmunoterapia oral para suprimir la respuesta hipersensible dependiente de Ig-E, aunque los resultados no han sido todavía efectivos.

REFERENCIAS

- [1] National Institute of Allergy and Infectious Diseases. "Food Allergy. An Overview." Julio, 2012.
- [2] Carina Venter. "Food Hypersensitivity: Diagnosing and Managing Food Allergies and Intolerances." Hindawi Publishing Corporation. Journal of Allergy. Volume 2012. Mayo, 2012.
- [3] J.L. Turnnull, H. N. Adams y D.A. Gorard. The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. Alimentary Pharmacology and Therapeutics. Octubre, 2014.
- [4] Peter K. Smith y Bernd Nilius. "Transient receptor potentials (TRPs) and anaphylaxis". Anaphylaxis and Drug allergy. Curr Allergy Ashma Rep. Septiembre, 2012.
- [5] Stefano Guandalini y Catherine Newland. "Differentiating food allergies from food intolerances". Curr Gastroenterol Rep. Julio, 2011.
- [6] E. Rivera, A. Assiri y S. Guandalini. "Celiac disease". Invited medical review. Oral diseases (2013).



Marta Sierra Cruz Alumna de 4º curso de Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

Las mascotas, ¿amigas del sistema immune?

M^a Teresa Romero Barragán y Virginia Vilar García

Resumen— ¿Te has planteado alguna vez el efecto que puede causar tu mascota en tu organismo? Sabemos que una gran parte de la población padece de alergia hacia estos amigos nuestros que tanta compañía nos hacen pero, ¿a qué es debido? ¿Existe alguna relación entre padecer alergia a mascotas y vivir con ellas? En este artículo responderemos a estas preguntas desde diferentes puntos de vista para poder aportar una perspectiva lo más completa posible de lo que se conoce hasta el momento sobre este tema.

Palabras Claves— Alergia, mascotas, alérgenos, IgE, IgG4

1. ¿QUÉ ES LA ALERGIA?

La alergia o hipersensibilidad de tipo I es una alteración del sistema inmunitario que provoca que éste responda de manera inadecuada (y comúnmente, con una respuesta más elevada de la normal) ante un antígeno.

Los linfocitos Th2 promueven la síntesis de la inmunoglobulina IgE cuando se presentan alérgenos. Esta síntesis se va a llevar a cabo gracias a la recepción de la interleuquina IL-4 y la no recepción de la interleuquina IL-10. Una vez sintetizados, las IgE van a interactuar con los mastocitos. La detección del alérgeno y de esta inmunoglobulina por parte del mastocito va a provocar la liberación de una serie de moléculas, entre las que destaca la histamina. Esta sustancia va a provocar una “llamada” de anticuerpos, leucocitos y componentes del sistema del complemento que, junto a otros compuestos, va a provocar los síntomas típicos de la alergia (asma, fiebre del heno, rinitis...)

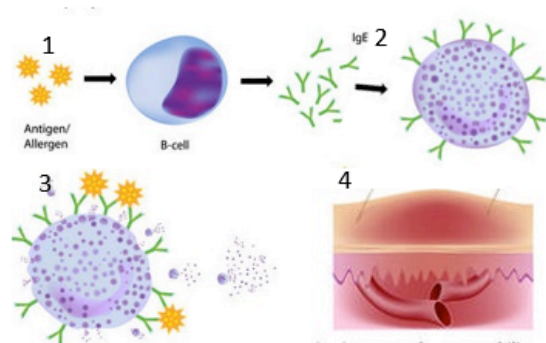


Fig. 1. Proceso de alergia. En el primer paso (1) encontramos el alérgeno, que es detectado por un linfocito B y que va a sintetizar inmunoglobulina IgE. Estos anticuerpos van a interactuar con los receptores específicos de los mastocitos (2) y junto con la detección nuevamente del alérgeno esta célula va a liberar histamina (3). Esto va a provocar una inflamación y una vasodilatación del tejido donde se produzca la liberación de esta sustancia (4)

2. ALERGIA A LAS MASCOTAS

Según estudios, la presencia de perros en el hogar ha resultado estar asociada negativamente con el riesgo de padecer hipersensibilidad. La razón de esto puede ser que la exposición a las mascotas influye en la respuesta inmune mediante varios mecanismos, algunos de los cuales pueden ser protectores, por ejemplo, incrementando la cantidad de endotoxinas o alérgenos en el ambiente case-ro. Se crea así un efecto de red de los diferentes mecanismos que pueden conferir protección al menos en ciertas poblaciones.

Existen varios mecanismos que explican el posible efecto protector de tener una mascota con respecto al riesgo de padecer hipersensibilidad. La respuesta de un linfocito Th2 modificado en niños expuestos a una alta cantidad de alérgeno animal se caracteriza por una producción de altos niveles de IgG e IgG4 sin producir IgE. Esta respuesta inmunitaria podría producir tolerancia, ya que IgG e IgG4 no producen reacción alérgica y suplen la presencia de IgE. Además, la alta presencia de endotoxina o cualquier otra sustancia pro-inflamatoria en un ambiente donde haya perros o gatos puede determinar una desregulación de la respuesta inmune frente a los antígenos de estos animales. El antígeno felino es más frecuente y potente que el antígeno canino; por lo que presumiblemente la producción de IgG4 en una edad temprana contra gatos será mayor que contra perros.

La exposición a perros está asociada con una reducción de la incidencia de la sensibilización alérgica y la dermatitis atópica en el primer año de vida y, además, en ella se incrementa la respuesta en las que intervienen IL-10 e IL-13. Al incrementar la cantidad de IL-10 presente en el organismo, la producción de IgE se va a ver disminuida, por lo que se produciría una menor sensibilización ante estos animales. Esto refuerza la idea de que tener perro produce una protección del sistema inmune.

Sin embargo, con respecto al gato parece ser que la presencia de este animal influye positivamente en el incremento de riesgo a la hora de desarrollar una hipersensibilidad al gato. En este caso parece haber una relación dosis-respuesta: a mayor nivel de alergia que se padece al principio del estudio, mayor riesgo de sufrir alergia al gato hay al final de éste. En otras palabras, la presencia en gran medida de IgE al principio del estudio va a ser crucial para el desarrollo de una alergia al gato. Por tanto, la exposición directa al gato en casa no parece ser un prerre-

quisito para el desarrollo de la sensibilización al gato, ya que los alérgenos felinos se pueden encontrar en espacios públicos siendo inevitables la exposición a ellos.

La cantidad de endotoxinas presentes dentro de una casa son altas debido a la presencia de animales, pero aún así, en casas sin animales también hay unos niveles suficientes de endotoxinas como para que se produzca una sensibilización. Esto quiere decir que tengas o no un animal en casa, siempre va a haber una predisposición a desarrollar una alergia contra un alérgeno animal. En algunos ambientes caseros sin mascotas pero con una cantidad sustancial de alérgenos animales de la que no se tiene constancia, se puede propiciar una situación en la que se adopte una sensibilización a alérgenos animales.

3. ALERGIA A ANIMALES EN LA NIÑEZ

Hace unos 20 años se recomendaba en algunos artículos científicos que las familias que tienen antecedentes de dermatitis atópica deberían esperar hasta que el bebé tuviera al menos 2 años para tener una mascota. También otro estudio mostraba que había más prevalencia de niños con alergia en aquellos que han estado expuesto a mascotas durante los primeros años de vida.

Sin embargo, posteriormente se demostró con mayores evidencias que estas afirmaciones no eran ciertas. De hecho, el periodo neonatal es importante en el posible desarrollo de alergias porque es un paso crítico en el desarrollo del sistema inmune. Por tanto, también va a serlo para enfrentar la posible sensibilización ante alérgenos animales. Hay varias evidencias que indican que el contacto temprano de los niños con los alérgenos de animales peludos puede determinar un menor riesgo de sufrir alergia a éstos. Tal fenómeno puede deberse a que si se inhalan de forma temprana, continua y abundante alérgenos felinos, se induce la producción de IgG e IgG4, los cuales pueden tener un efecto protector.

La exposición a perros en la vida temprana se asocia, por tanto, con un único patrón del sistema inmune; que podría ser conducido por estímulos del sistema inmune innato, como se ha explicado anteriormente. De hecho, los niños que dejan de tener perro a la edad de 3-6 años tienen un incremento del riesgo de padecer resuello comparado con niños que han estado constantemente expuestos a los perros desde su nacimiento hasta los 6 años, ya que el sistema inmune no se habría desarrollado y fortificado por completo.

El contacto diario con perros desde el primer año de vida resulta ser un factor protector contra el asma, la fiebre del heno, la rinitis alérgica y la sensibilización al polen y al gato. Curiosamente, no se encontró ninguna relación de estas características con otras mascotas.

En otros estudios en los que se establece una distinción entre familias con alto y bajo riesgo de padecer este tipo de enfermedades se obtuvieron unos resultados ligeramente diferentes, pues en ellos se especifica un más detalladamente los efectos en niños de la presencia del perro en los hogares. La exposición al perro en ciudades puede llegar a tener efectos protectores contra el riesgo de enfermedades alérgicas en poblaciones de bajo riesgo contra la sensibilización, mientras que en poblaciones de alto riesgo no se tiene una respuesta clara.

4. ALERGIA A ANIMALES EN ADULTOS

Estudios recientes muestran que una exposición temprana de los niños a los alérgenos de mascotas comunes puede llevar a un nivel más bajo de sensibilización al alérgeno en edades más tardías. Por ejemplo, la posesión de un gato antes de los 18 años protege contra el asma desarrollado durante la edad adulta y atopía. Además, los niños que han sido criados con más de dos perros o gatos en sus primeros años de vida no solo están protegidos frente a los alérgenos de esos animales, sino que también lo están a otros alérgenos comunes, como el polen.

La exposición de la población adulta al gato en casa está asociada con un incremento del riesgo de desarrollar una hipersensibilidad promovida por la inmunoglobulina IgE. Esto es lógico, ya que no se han desarrollado IgG4 que pudieran "sustituir" a la inmunoglobulina IgE. Sin embargo, se ha observado que este efecto no es tan acusado ante una exposición a perros; pues de hecho puede incluso evitar un desarrollo de la rinitis alérgica.

5. CONCLUSIONES

Normalmente, la sensibilización alérgica a los gatos se reduce en los pacientes que están expuestos a grandes o muy bajas cantidades de alérgenos. Sin embargo, el riesgo de sufrir una sensibilización a los gatos aumenta cuando están expuestos a una cantidad moderada de alérgeno. Esto quiere decir que la probabilidad de sufrir alergia contra gatos es mayor si no se tiene este tipo de mascota que si viven con ellos. Esta afirmación puede corroborar la diversidad de resultados que se han expuesto a lo largo de esta revisión y las posibles contradicciones que se puedan encontrar: se está analizando un cuadro clínico en distintas situaciones y por tanto, con distintas cantidades de antígeno en cada caso.

Por otra parte, tener perro parece estar asociado con una menor sensibilización tanto a los alérgenos caninos como a otros alérgenos aéreos e incluso al asma. Queda demostrado que en la mayoría de los casos, su presencia sobre en edades tempranas confiere cierta protección ante el padecimiento de alergias.

Es importante resaltar la necesidad de seguir realizando estudios, tanto epidemiológicos como relacionados con los mecanismos moleculares de estas enfermedades, para poder llegar a un consenso global sobre la relación existente entre la presencia de mascotas y el riesgo de desarrollo de la hipersensibilidad. Además, no podemos generalizar y dar por sentado que las afirmaciones expuestas van a afectar a todos los pacientes por igual, pues hay que tener en cuenta que estos estudios son clínicos y basados en cálculos estadísticos.

En conclusión, el hecho de evitar tener una mascota puede como mucho modular los efectos protectores a la alergia pero nunca sería la razón de éstos. La exposición a mascotas peludas u otros factores relacionados con esta exposición a edades tempranas puede resultar ser protector contra las alergias; por lo que tener mascotas en esta caso no sería perjudicial, sino beneficioso³.

REFERENCIAS

- [1] Linneberg, A., Nielsen, N. H., Madsen, F., Frolund, L., Dirksen, A., & Jorgensen, T. (2003). Pets in the home and the development of pet allergy in adulthood. The Copenhagen Allergy Study. *Allergy*, 58(1), 21-26. <http://doi.org/10.1034/j.1398->

9995.2003.23639.x

- [2] Liccardi, G., D'Amato, G., D'Amato, L., Salzillo, A., Piccolo, A., De Napoli, I., Cazzola, M. (2005). The effect of pet ownership on the risk of allergic sensitisation and bronchial asthma. *Respiratory Medicine*, 99(2), 227–233. <http://doi.org/10.1016/j.rmed.2004.05.012>
- [3] Heinrich, J. (2002). Exposure to pets and allergies in children. *Pediatric Allergy and Immunology*, 13(5), 334–341. <http://doi.org/10.1034/j.1399-3038.2002.02063.x>
- [4] Bufford, J. D., Reardon, C. L., Li, Z., Roberg, K. a., DaSilva, D., Eggleston, P. a., ... Gern, J. E. (2008). Effects of dog ownership in early childhood on immune development and atopic diseases. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(10), 1635–1643. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03018.x>
- [5] Gereda, J. E., Klinnert, M. D., Price, M. R., Leung, D. Y., & Liu, A. H. (2001). Metropolitan home living conditions associated with indoor endotoxin levels. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(5), 790–6. <http://doi.org/10.1067/mai.2001.115245>
- [6] Ahlbom, A., Backman, A., Foucard, T., Halken, S., Kjellman, N.-I. M., Malm, L., Skerfving, S., B., & Sundell, J., Z. O. (1998). "NORD-PET". Pets indoors - A Risk Factor or Protection against sensitisation/Allergy. A Nordic Interdisciplinary Review of the Scientific Literature Concerning the relationship between the Exposure to Pets at Home, Sensitisation and the Development of Allergy. *Indoor Air* 1998; 8:219-235., 219–235.
- [7] Hesselmar, B., Åberg, N., Åberg, B., Eriksson, B., & Björkstén, B. (1999). Does early exposure to cat or dog protect against later allergy development? *Clinical and Experimental Allergy*, 29, 611–617. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00534.x>
- [8] Lodge, C. J., Allen, K. J., Lowe, A. J., Hill, D. J., Hosking, C. S., Abramson, M. J., & Dharmage, S. C. (2012). Perinatal cat and dog exposure and the risk of asthma and allergy in the urban environment: a systematic review of longitudinal studies. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 176484. <http://doi.org/10.1155/2012/176484>
- [9] Página web de imágenes Focmag: <http://www.focmag.com/p/anaphylactic-reactions.html>



Mª Teresa Romero Barragán estudia cuarto de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla). Es alumna interna en la División de Neurociencia del Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología celular desde octubre de 2015. Realizó una estancia Erasmus en la Ruhr-Universität Bochum (Alemania) durante el curso 2014/2015.



Virginia Vilar García es estudiante de cuarto del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla). Alumna interna en el Área de Microbiología desde septiembre de 2015. Realizó una estancia Erasmus durante el curso 2014/2015 en la Eberhard Karls Universität Tuebingen (Alemania).

Xenotrasplantes, ¿el futuro?

Jara Cárcel-Márquez, M^a de los Ángeles Valera-Cerdá

Resumen— Debido a la gran necesidad de trasplantes, se está buscando alternativas como son los xenotrasplantes, ya que estos supondrían una fuente casi inagotable de órganos. Para las investigaciones en este campo se usan principalmente cerdos gracias a sus numerosas ventajas: grandes camadas, tamaño de los órganos, consideraciones éticas... Para poder tener esta opción como algo viable hay que minimizar los problemas que conlleva el trasplante de un órgano de un animal tan alejado evolutivamente. Estos problemas vendrían dados por el rechazo hiperagudo, el rechazo agudo humoral, el rechazo agudo celular, la disparidad en la cascada de coagulación y la xenozoonosis. Todos estos problemas se están investigando para poder minimizarlos y eliminarlos. Todo esto con el objetivo de hacer de esta una tecnología factible y que, por tanto, seamos capaces de acabar con las listas de espera.

Palabras Claves—Cerdo, Ingeniería genética, Inmunología, Rechazo, Xenotrasplantes.

1. ¿POR QUÉ XENOTRASPLANTES?

No es desconocida la gran necesidad de trasplantes que existe hoy en día en la sociedad. Un ejemplo de esto son los 5571 enfermos en lista de espera para un trasplante, en 2014 en España ¹. Un dato más actualizado nos dice que solo en Madrid a principios de 2015 había más de 900 personas esperando un trasplante ². La realidad es que muchas de estas personas no llegarán a tener el órgano deseado, ya que, a pesar de ser España el país que encabeza el número de donantes de órganos, no es tan abundante la donación de órganos como para suplir esta necesidad.

Aquí es donde entran en juego los xenotrasplantes. Vista la gran necesidad de trasplantes para acabar con las listas de esperas y por tanto alargar la vida a un gran número de personas. ¿Por qué no usamos los animales como fuente de ellos? El uso de los animales como suministro, nos daría una fuente prácticamente inagotable de órganos. Y aunque no esté actualmente el estado del arte para ver esta opción como algo definitivo, se piensa usar como colchón de tiempo que alargue la vida a esas personas que esperan el trasplante hasta que lo puedan recibir.

2. ¿QUÉ ANIMAL USAMOS?

Dentro de la gran diversidad del mundo animal sería, en principio, difícil decantarse por uno. Sin embargo los estudios en este campo no se han desviado mucho en este aspecto. En primer lugar lo primero que podemos pensar para minimizar el rechazo es el uso de primates no humanos, como el chimpancé y el babuino. Con estos animales se han tenido unos resultados bastante prometedores. Ejemplo de ello son los 9 meses que duró el trasplante de riñón de chimpancé a humano en 1963³. Esto conllevaría un margen mayor en la lista de espera hasta recibir el alotrasplante y por tanto se minimizarían los fallecimientos por no conseguir el órgano a tiempo.

A pesar de los buenos resultados que se han tenido con

primates no humanos estos no son los animales que actualmente se están estudiando para ser fuente de órganos. El porqué de esto es debido a varios aspectos. Por un lado, la cría de estos animales es compleja al no dar descendencia en grandes camadas. También el riesgo de transmisión de enfermedades sería muy elevado, por la propia cercanía evolutiva. Además los órganos, en general, tienen un tamaño bastante diferente al que presentan los humanos. Y finalmente, un punto clave en descartar estos animales es debido a las consideraciones éticas que implica el uso de unos animales tan cercanos evolutivamente a nosotros. Como ya veremos, si son aceptados (siempre que se sigan estrictamente los protocolos necesarios) para poder simular como reaccionaría un trasplante de otro animal en un primate, pero no para la cría a gran escala de primates no humanos como fuente de órganos. En este contexto aparece el cerdo. Que a pesar de tener desventajas como su lejanía evolutiva, lo que aumenta el riesgo de rechazo, se considera el animal estrella en xenotrasplantes por lo siguiente.

- **Generación de grandes camadas**, lo que hace factible el uso de estos animales para la obtención a gran escala de órganos.
- **Tamaño de órganos** más adecuado a humanos
- **Cría: rápida, fácil y barata**. Además los podemos crecer en condiciones libres de patógenos, haciendo menos probable la transmisión de infecciones.
- **Ingeniería genética**. Se tiene mucha más experiencia en ingeniería genética de cerdos ⁴ de la que se tiene con primates no humanos, la cual es prácticamente nula
- **Consideraciones éticas**. La sociedad no tiene prejuicios, en general, en usar estos animales para xenotrasplantes ya que son ampliamente usados para alimentación.

A pesar de la idoneidad del uso del cerdo como fuente de órganos, el xenotrasplante no está exento de problemas.

3. PROBLEMAS Y SOLUCIONES ENCONTRADAS

Cuando se realiza un xenotrasplante existe un principal problema, más allá que el de la propia intervención quirúrgica, que es el rechazo del órgano trasplantado, el cual puede darse por distintas causas.⁵ En primer lugar existe un rechazo automático, que puede aparecer desde los primeros minutos. Es conocido como **rechazo hiperagudo** y causa la formación de microtrombos en el tejido y la rápida muerte del receptor.⁶ Este rechazo es causado por la presencia en nuestro organismo de IgM y G preformadas contra ciertas estructuras celulares de otras especies, concretamente anticuerpos Anti-Gal (contra la glicosilación galactosa- α -1,3-galactosa, no presente en humanos) y anticuerpos Anti-NeuGc (anti ácido n- glicolilneuroamínico), lo que se ve favorecido por el hecho de comer carne de cerdo.^{6,7,8} En 2002 se encontró una solución a esta primera barrera de rechazo, la creación de los cerdos GTKO, que tienen interrumpido el gen que codifica para la Glicosil Transferasa, enzima responsable de la glicosilación que causa el rechazo.^{6,9} Este descubrimiento acaparó portadas en revistas científicas de prestigio, creyéndose que se había encontrado la fórmula que permitiría el uso de xenotrasplantes de cerdo de forma habitual. Sin embargo, al superar esta barrera, se encontraron nuevas formas de rechazo, enmascaradas por la rapidez del rechazo hiperagudo.

Una segunda forma de rechazo es el llamado **rechazo humoral agudo**, mediado por anticuerpos.^{6,10} En este tipo de rechazo ocurren heridas en los tejidos trasplantados causadas por una activación del sistema del complemento.^{7,10} En los tejidos afectados por este rechazo se han encontrado Linfocitos T dependientes de anticuerpos, neutrófilos, macrófagos y células NK, aunque no se conoce exactamente su rol.⁷ De cara a encontrar un remedio al mismo no es una opción eliminar el complemento del receptor ya que quedaría desprotegido a nivel inmunológico.⁷ Por tanto, la idea es moderar su acción introduciendo genes de marcadores humanos en los cerdos para los xenotrasplantes, proteínas que modulan la respuesta del complemento para que éste no ataque al órgano trasplantado. Entre ellas se utilizan CD46, CD55, CD59 y CD39.^{5,6,7,11} Solventado este problema, se observó la aparición de un tercer tipo de rechazo, que parecía estar enmascarado por las anteriores formas de rechazo más inmediatas, el **rechazo agudo celular**. Este es producido por una infiltración de células T y B en el tejido trasplantado y una activación de los linfocitos T.^{5,10} El rechazo agudo celular suele tratarse tanto en alo como xenotrasplantes con terapias inmunosupresoras, principalmente con corticosteroides. Estos son hormonas esteroideas antiinflamatorias que actúan a distintos niveles de la cascada inmune: regulan el número, subtipos y función de los linfocitos T, así como a la producción de linfoquinas.^{5,12} Sin embargo, se dan casos de personas resistentes a este inmunosupresor, por lo que hay otras terapias alternativas basadas en anticuerpos monoclonales anti-linfocitos T, generalmente de ratón o caballo, cuya diana son receptores necesarios para la activación de los linfocitos T del receptor. Los más comunes son los OKT3, ATG y ALG.¹³ Utilizando este tratamiento inmunosupresor se consigue evitar totalmente este tipo

de respuesta. Sin embargo, esto no es suficiente para realizar un xenotrasplante exitoso.

Existe riesgo de sufrir un **rechazo crónico**, que parece ocurrir por el simple hecho de realizar un trasplante.^{5,6} Se presenta como una vasculopatía y al no conocerse el mecanismo exacto del rechazo no hay terapias con un claro resultado frente a él.⁵ Suelen usarse fármacos inmunosupresores como la leflunomida y ciclosporina, que parecen reducir la tasa de rechazo crónico, aunque no se conoce el mecanismo.^{5,14} Sin embargo, incluso en pacientes que siguen terapias inmunosupresoras de por vida puede aparecer un rechazo crónico años después del trasplante.^{5,15} Recientemente se está probando un nuevo tratamiento mediante el uso de células madre mesenquimáticas propias del propio receptor, aunque el éxito de esta estrategia no está confirmado.¹⁴

A parte de estos rechazos mediados por el sistema inmunológico, existen otros mecanismos de repulsión del órgano xenotrasplantado ajenos a este. Por ejemplo, existe una forma de rechazo causada por una **disparidad ente las cascadas de coagulación** del cuerpo humano y las señales que manda el tejido trasplantado, de tal forma que las señales parecen ser no compatibles y el órgano trasplantado cree que no está curando sus heridas convirtiéndose en un verdadero sumidero de factores de coagulación.^{5,6} Esto acaba provocando hemorragias tanto a nivel del órgano trasplantado como en otras zonas del organismo.⁶ Esta sigue siendo a día de hoy la principal causa de muerte de los organismos receptores de xenotrasplantes.¹⁶ Su mecanismo sólo está comenzando a comprenderse hoy en día, y parece estar regulado por la expresión de un factor de coagulación TF (tissue factor) en el órgano trasplantado.⁵ Esto significa que se empiezan a conocer posibles dianas de cara al desarrollo de tratamientos futuros, enfocados a la expresión en el donador de genes involucrados en la cascada de coagulación del receptor, como la trombomodulina o el propio TF.⁵

A parte, sigue existiendo el riesgo de sufrir infección por virus, bacterias, hongos y parásitos que existe por el hecho de realizar un xenotrasplante, lo que se conoce como **xenozoonosis**. Todos los patógenos mencionados salvo los virus se pueden eliminar con un cuidado correcto de los animales donadores, condiciones de higiene y salud correctas.⁶ El de los virus parecía un problema más difícil de solucionar. Se detectó la presencia de 62 retrovirus insertados en el genoma del cerdo (PERVs) que podrían saltar e infectar a los humanos, y hasta ahora no se podían eliminar y sólo controlar.⁶ Con el descubrimiento de la tecnología CRISPR/Cas9, en 2015 unos investigadores de la Universidad de Harvard consiguieron gracias a ella alterar las 62 copias de retrovirus endógenos del genoma de las células del cerdo, consiguiendo una reducción en más de 1.000 veces de su transmisión a células humanas in vitro.¹⁶

4. CONCLUSIONES

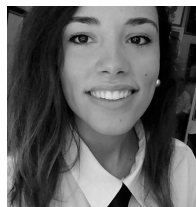
Con todos los avances que hemos ido comentando desde los cerdos GTKO, hasta la eliminación de los 62 retrovirus del genoma de estos animales gracias al sistema

CRISPR/Cas9. Vemos un futuro muy prometedor a este campo de investigación. Todas estas estrategias aplicadas en su conjunto nos acercan un paso más a nuestro objetivo, aunque aún queda un largo camino para poder usarlos como una terapia real y viable.

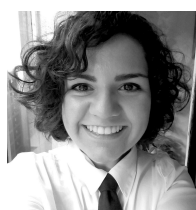
- [16] L. Yang, M. Güell, D. Niu, H. George, E. Lesha, D. Grishin, J. Aach, E. Shrock, W. Xu, J. Poci, R. Cortazio, R.A. Wilkinson, J.A. Fishman, G. Church. "Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)". *Scienceexpress* 11 October, 2015: 1-6

REFERENCIAS

- [1] Web del 20minutos, 2015. <http://www.20minutos.es/noticia/2344936/0/espana/record-trasplantes/2014/>
- [2] Web de la Vanguardia, 2015. <http://www.lavanguardia.com/local/madrid/20150119/54423520739/mas-de-900-pacientes-en-lista-de-espera-para-trasplantes-de-organos-en-madrid.html>
- [3] D. K. C. Cooper. "A brief history of cross-species organ transplantation" *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2012 Jan; 25(1): 49-57. PMID: PMC3246856
- [4] D. H. Sachs y C. Galli. "Genetic Manipulation in Pigs". *Curr Opin Organ Transplant*, 2009 Apr; 14(2): 148-153. PMID: PMC2687522. NIHMSID: NIHMS94591
- [5] B. Ekser and D.K.C. Cooper "Overcoming the barriers to xenotransplantation: prospects for the future". *Expert Rev Clin Immunol*. 2010, 6(2): 219-230.
- [6] P.J. Cowan., D.K.C. Cooper, A.J.F. d'Apice. "Kidney xenotransplantation". *Kidney International*, 2014. 85: 265-275.
- [7] J.L. Platt, G.M. Vercellotti, A.P. Dalmaso, A.J. Matas, R. Morton, J.S. Najarian, F.H. Bach. "Transplantation of discordant xenografts: a review of progress". *Immunology today*, 1990. 11(12): 450-456.
- [8] Y. Dai, T.D. Vaught, J. Boone, S. Chen, C.J. Phelps, S. Ball, J.A. Monahan, P.M. Jobst, K.J. McCreath, A.E. Lamborn, J.L. Cowell-Lucero, K.D. Wells, A. Colman, I.A. Polejaeva, D.L. Ayares. "Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs". *Nature Biotechnology*, 2002. 20: 251-255.
- [9] J.L. Platt. "Knocking out xenograft rejection". *Nature Biotechnology*, 2002. 20: 231-232.
- [10] H.Jr. Auchincloss. "Xenografting: A review". *Transplantation Reviews*, 1990. 4(1):14-27.
- [11] S. Le Bas-Bernardet, X. Tillou, N. Poirier, N. Dilek, M. Chatelais, J. Devallière, B. Charreau, D. Minault, J. Hervouet, K. Renaudin, C. Crossan, L. Scobie, P.J. Cowan, A.J.F. d'Apice, C. Galli, E. Cozzi, J.P. Soulillou, B. Vanhove, G. Blancho "Xenotransplantation of Galactosyl-Transferase Knockout, CD55, CD59, CD39, and Fucosyl-Transferase Transgenic Pig Kidneys Into Baboons". *Transplantation Proceedings*, 2011. 43: 3426-3430.
- [12] A. E. Coutinho y K.E. Chapman "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights". *Mol Cell Endocrinology*, 2011. 335(1): 2-13.
- [13] M-R. Ganji, B. Broumand "Acute Cellular Rejection". *Iranian Journal of Kidney Diseases*, 2007. 1(2): 54-56.
- [14] J. Rossignol. "Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation". *J Cell Mol Med*, 2009. 13(8B): 2547-58.
- [15] B. Ekser, E. Klein, J. He, D.B. Stolz, G.J. Echeverri, C. Long, C. Che Lin, M. Ezzelarab, H. Hara, M. Veroux, D. Ayares, D.K.C. Cooper, B. Gridelli. "Genetically-Engineered Pig-to-baboon liver xenotransplantation: Histopathology of xenografts and native organs". *PLoS ONE*, 2012. 7(1):1-11.



Jara Cárcel Márquez. Alumna actualmente de 4º de Biotecnología.



María de los Ángeles Valera Cerdá. Alumna actualmente de 4º de Biotecnología.

Pancreas organogenesis, a focus on Pax4

Gonzalo R. Vázquez-Gómez

Abstract—The pancreas is a glandular organ with a double soul: endocrine and exocrine. Functionally, these translates into the secretion of digestive enzymes into the gut and nutrient-homeostasis regulation hormones into the bloodstream. Morphologically, it has two differentiated cell populations: endocrine cells, packed into the islets of Langerhans, and exocrine cells, that form the vast majority of the pancreas arbor structure. It has an endodermic origin, arising as two buds in the dorsal and ventral side of the endodermic foregut and branching during development through protrusion structures. This development is coordinated by a complex signaling and transcriptional network in which Pdx1 has a leading role, determining pancreas progenitors. Pax4, expressed later in development and adulthood, is specifically reviewed here due to its β -cell mass regulation capabilities and the chances it offers to design a new therapy for diabetes, caused by insulin producing cells dysfunction.

Key words— Pancreas development, pancreas organogénesis, Pax4, pancreatic endoderm.

1. INTRODUCTION: PANCREAS PHYSIOLOGY

The pancreas is a glandular organ located behind the stomach, in the intraperitoneal cavity of higher vertebrates. In humans it weighs from 70 to 150 grams, being from 15 to 25 centimeters long. It is a composite gland formed by two distinct cell populations that differ functionally and morphologically: the exocrine pancreas secrete enzymes into the digestive tract, whereas the endocrine pancreas secretes hormones into the bloodstream. This mixed character makes it part of both the endocrine system and the digestive system.

The exocrine pancreas consists of enzyme producing acinar cells, organized into clusters called acini (figure 1B), and a duct system that drains the digestive fluid into the intestine. It comprises a lobulated tree-like structure, where acini secrete enzymes into the acinar ducts at the branch tips. Duct cells secrete bicarbonate and mucins, and funnel the digestive secretions into the main duct,

connected to the duodenum by the ampulla of Vater, where it joins the bile duct, as observed in figure 1A.

The acinar cells present pyramidal shape and prominent rough endoplasmic reticulum and Golgi complex, along with multiple secretory granules (zymogen) containing digestive enzymes such as proteases, amylases, lipases and nucleases. Most of them are synthesized as inactive precursors to protect the organ, and are activated once they reach the duodenum. This secretion is regulated by hormonal and neural stimuli.

The endocrine tissue is formed by islets of Langerhans, confined spheroidal structures (as seen in figure 2) that constitute around 5% of the pancreas weight and are spreadly located throughout the organ. They are heavily irrigated, as they secrete hormones directly into the bloodstream and are responsive to different blood pa

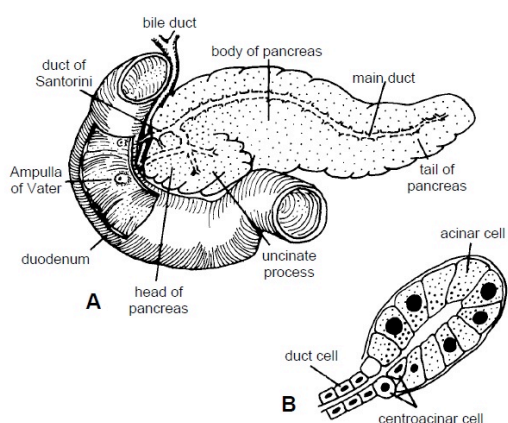


Fig. 1. Pancreas anatomy. Reproduced from Slack, 1995 [1].

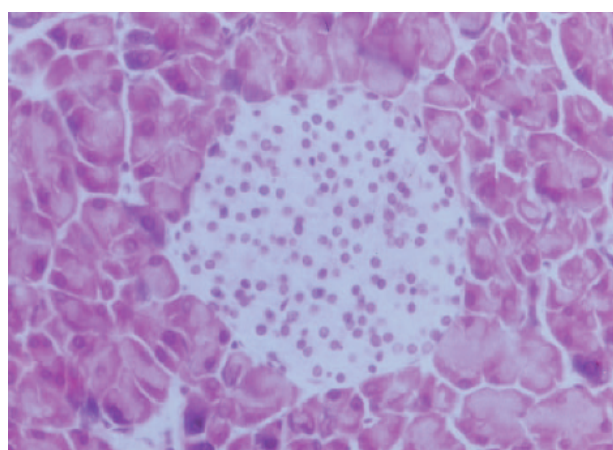


Fig. 2. Histology of the mouse pancreas, phloxin stain. An islet of Langerhans is showing in the centre, surrounded by acinar cells and ducts. Reproduced from Slack, 1995 [1].

rameters. Within the islets we can find glucagon producing α -cells, insulin producing β -cells, somatostatin producing δ -cells, ghrelin producing ϵ -cells and pancreatic polypeptide producing γ -cells.

These hormones produced by the endocrine pancreas are involved in nutrient metabolism and glucose homeostasis, which added to the digestive fluid production function, makes the pancreas a strategic center for nutritional homeostatic regulation.

2. PANCREAS ORGANOGENESIS

Pancreatic development is a complex, highly coordinated interplay of inner and outer signaling events and transcriptional networks. Both exocrine and endocrine pancreas have an endodermic origin, some stromal components being mesodermally-derived. The endoderm flat sheet folds to create the primitive gut tube, organized into foregut, midgut and hindgut. This gut endoderm is regionalized into different organ fields by antero-posterior and dorso-ventral patterning mediated by external signals produced by surrounding mesoderm and internal transcriptional programs. The foregut-midgut boundary is the site for pancreas specification [1].

Two different buds emerge from the foregut, dorsal and ventral, that will later fuse to form a single body. Proliferation of committed pancreas progenitors produce a strati-

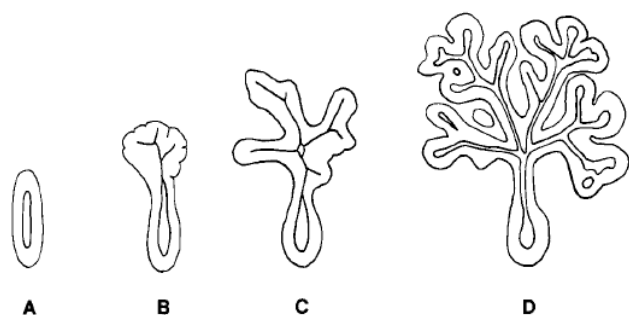


Fig. 3: Progressive branching forming the arbor structure. Reproduced from Slack, 1995 [1].

fied epithelium, in which multiple microlumens appear, forming a growing arbor as seen in figure 3. These microlumens are the first sign of a vast, developing luminal network that will eventually drain acinar secretions into the intestine [1].

Differentiated endocrine cells start to appear in the dorsal bud at this stage, in a cluster-budding process. The gut tube undergoes some coiling movements that make ventral and dorsal bud closer, and they end up fusing together (figure 4). The epithelium undergoes plexus remodeling while it continues expansion and production of more plexus through finger-like protrusions into the surround-

ing mesenchyme. The protrusions contain tip and trunk domains, tips being multipotent pancreatic cells (MPC) that will become acinar-fated progenitors and trunks being an endocrine-duct bipotential cell pool. Epithelial branching and polarity is thought to be mediated by the interaction of neural migration factors, such as netrins, with extracellular matrix proteins such as integrins [2].

After this expansion, the number of the progenitor cells in

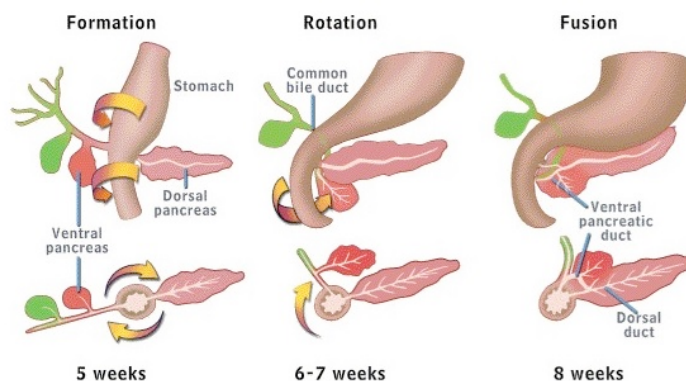


Fig. 4. Foregut coiling movements bring dorsal and ventral pancreas together, allowing them to fuse. Reproduced from The exocrine Pancreas, Pandolfi SJ, 2010.

the pancreas primordium determines final size of the mature pancreas. Over the time, human pancreas becomes less proliferative, the remaining proliferation being in the periphery.

Once the basic structure is organized, the epithelium undergoes a differentiation wave and cell lineage allocation. Extending tip epithelium becomes acinar cells and continues to branch by duplication. Endocrine cells differentiate from endocrine-biased progenitors in the protrusion trunks, going through an epithelial-to-mesenchymal transition, and migrating to assemble into clustered endocrine islets. These islets remain in the whereabouts of their parent trunks, in between acini and ducts [3].

2.1. Signalling events and transcriptional networks

The morphological and functional development of the pancreas is regulated by signaling events, internal and external, driven by the transcription factors, proteins that bind DNA and are capable of changing expression of targeted genes.

The notochord, an anteroposterior axis mesoderm-derived structure located in the dorsal area and precursor to vertebrae, is responsible for the patterning of the adjacent foregut to develop into the dorsal pancreatic bud by inhibiting transcription of sonic hedgehog (Shh) and thus allowing expression of the central pancreas development factor pancreatic and duodenal homeobox factor 1 (Pdx1) [2]. This is considered the switch that triggers pancreas development from the endoderm foregut tube [4]. In humans, Pdx1 expression starts around 30 day post-

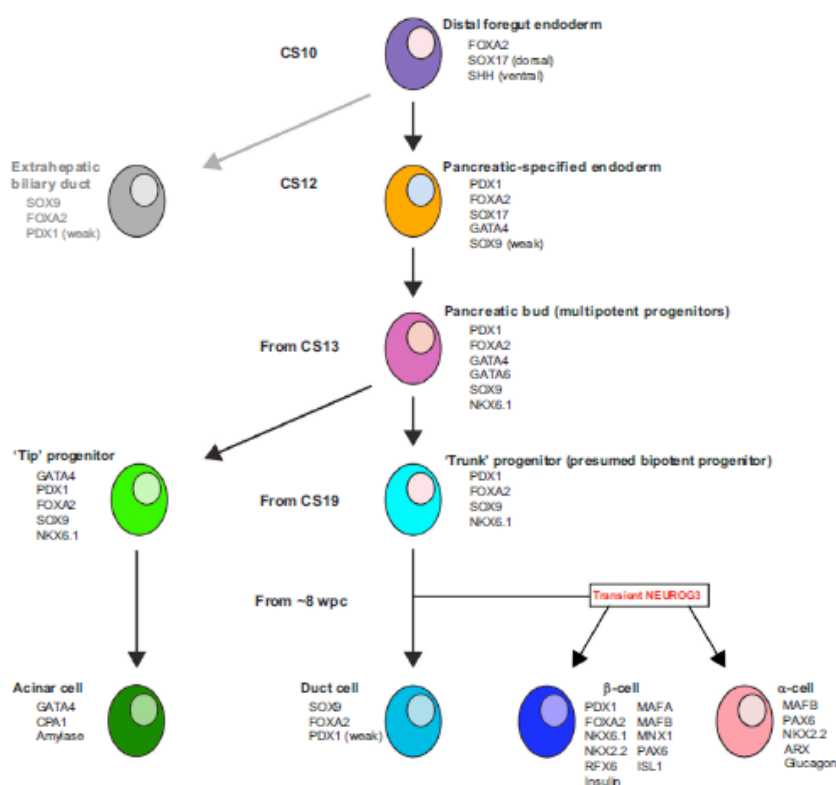


Fig. 5. Transcription factor network of human pancreas development. Reproduced from Jennings, 2015 [2].

conception (dpc). Ventral and pancreatic buds express sex-determining region Y-box 9 (Sox9), GATA binding protein 4 (Gata4) in addition to Pdx1 around 32 dpc. SOX9, GATA4 and PDX1 are essential transcription factors for human pancreatic growth. Differences become noticeable in pancreatic progenitors by 46 dpc, when protrusion structures are leading pancreas growth. In them, trunks (bipotent for duct and endocrine cells) express high levels of SOX9 and NKG6.1 but low levels of GATA4, contrary to tips (future acinar cells) that have high expression of all the three factors [5].

For endocrine cell specification, neurogenin 3 (Neurog3) is the transcription factor transiently required for a trunk cell to commit into a hormone production cell. As seen in figure 5. That happens around 8 week post-conception (wpc). SOX9 is at this time lost in endocrine tissue, and only remains in duct cells. Islets start to be seen at 12-13 wpc and Neurog3 shuts its transcription at some point after 26 wpc. Knowledge of the pancreatic organogenesis transcriptional network supports the development of new approaches to treat diabetes, such as β -cell in vitro differentiation and grafting [6].

2.2. Pax4 as a master regulator for islet development

Pax4 has been shown to be key for the establishment of β -cell lineage during development [7], but also there is evidence for its role in mature β -cell expansion. For this reason Pax4 has attracted focus aiming to create new ap-

proaches to treat type 1 diabetes, which is characterized by a loss of β -cell mass due to autoimmune attack.

Sosa-Pineda et al demonstrated in 1997 [8] that Pax4 is essential for differentiation of insulin-producing β -cell in the mammalian pancreas. In order to do so they disrupted Pax4 gene in mice by homologous recombination, inserting LacZ in its locus, in embryonic stem cells. Disrupted clones were selected to create chimeras by morula aggregation. Heterozygous mice did not show any relevant changes in the phenotype, surviving adulthood and being fertile. Homozygous null Pax4 mice were born apparently normal, nonetheless two days after birth they showed growth retardation and dehydration, signs of beta-cell dysfunction, and died three days after birth. This phenotype was similar to homozygous null Pdx1 mice, which completely lack pancreas, however a macroscopically normal pancreas developed in Pax4 deficiency. In Pax4^{-/-} newborn pancreas histological study LacZ showed to be co-expressed with insulin, indicating that Pax4 was expressed in β -cells. This, together with the diabetes-like phenotype that Pax4 full deficient mice showed, pointed towards the importance of Pax4 in β -cell differentiation.

In mice, PAX4 appears in the pancreatic bud around 9 dpc and peaks around 14 dpc. Mutant Pax4 mice embryos show scattered insulin-staining cells at early stages of development, however they are born with no functional β -cells, which suggests Pax4 is not critical for cell fate determination but for sustaining insulin-producing phenotype and supporting cell proliferation and survival of the committed cells [9].

Expression of Pax4 has been detected in the adult mammal β -cells. Several mutations of such gene has been associated in different populations with diabetes, consistent with a role in β -cell mass regulation.

The concerted action of key pancreatic factors such as Pan1, Beta2/NeuroD, HNF-1 α and Pdx1 among others regulate the expression of Pax4. These genes were also shown to be associated with genetic diabetes, which suggests Pax4 is a downstream target of these diabetes-associated transcription factors [9].

In addition, it was shown that activin A and betacellulin stimulated Pax4 gene expression and that produced an increase of rat β -cell replication. Over-expression of the gene in rats caused an augmented expression of the c-myc/Id2 proliferation pathway and the antiapoptotic gene Bcl-xl. All these evidences suggest that Pax4 is in charge of coordinating apoptosis and proliferation in β -cells [9].

3. CONCLUSIONS

Further studies are required to get to know how Pax4 responds to physiological stimuli and how it balances β -cell proliferation and apoptosis to achieve a β -cell mass that fills the body's insulin needs. This way we might be able to design a new approach against diabetes by targeting Pax4 to gain β -cell function. Pax4 is a paradigm on how knowledge about organ development can help us develop therapies for a myriad of diseases through the advent of tissue engineering, intimately related to developmental biology.

REFERENCES

- [1] J. Slack, "Developmental Biology of the Pancreas," *Development*, vol. 121, pp. 363–398, 1995.
- [2] R. E. Jennings, A. A. Berry, J. P. Strutt, D. T. Gerrard, and N. A. Hanley, "Human pancreas development," *Development*, vol. 142, no. 18, pp. 3126–37, 2015.
- [3] G. K. Gittes, "Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review," *Dev. Biol.*, vol. 326, no. 1, pp. 4–35, 2009.
- [4] M. C. Jørgensen, J. Ahnfelt-Rønne, J. Hald, O. D. Madsen, P. Serup, and J. Hecksher-Sørensen, "An illustrated review of early pancreas development in the mouse," *Endocr. Rev.*, vol. 28, no. 6, pp. 685–705, 2007.
- [5] F. C. Pan and C. Wright, "Pancreas organogenesis: From bud to plexus to gland," *Dev. Dyn.*, vol. 240, no. 3, pp. 530–565, 2011.
- [6] K. A. D'Amour, A. G. Bang, S. Eliazar, O. G. Kelly, A. D. Agulnick, N. G. Smart, M. A. Moonman, E. Kroon, M. K. Carpenter, and E. E. Baetge, "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 11, pp. 1392–1401, 2006.
- [7] C. Dohrmann, P. Gruss, and L. Lemaire, "Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas," *Mech. Dev.*, vol. 92, no. 1, pp. 47–54, 2000.
- [8] B. Sosa-Pineda, K. Chowdhury, M. Torres, G. Oliver, and P. Gruss, "The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas," *Nature*, vol. 386, no. 6623, pp. 399–402, 1997.

- [9] T. Brun and B. R. Gauthier, "A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease," *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 40, no. 2, pp. 37–45, 2008



Gonzalo R. Vázquez Gómez is a Biochemistry graduate (Córdoba University, Spain, 2015) and is currently undertaking a MSc in Health Biotechnology (Pablo de Olavide University, Seville, Spain). He researched genome biology and tissue engineering in Cardiff University, and his MSc thesis focuses on the role of liponeogenesis in metabolic diseases.

Enfermedad Granulomatosa Crónica

Luna Jiménez Castilla

Resumen— La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) es una enfermedad no muy común que afecta principalmente a los neutrófilos y monocitos impidiendo su correcto funcionamiento. La enzima NADPH oxidasa de estas células no es totalmente funcional debido a una mutación que desemboca en su nulidad a la hora de generar superóxido para destruir los patógenos en las células fagocíticas. Los síntomas son muy variados, siendo el principal la aparición de infecciones recurrentes que afortunadamente, gracias al desarrollo médico y farmacéutico actual, pueden tratarse sin demasiada dificultad.

Palabras Claves— EGC, infección, oxígeno, NADPH, antibiótico.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad granulomatosa crónica (EGC) o granulomatosis crónica es un trastorno hereditario y poco frecuente que se caracteriza por la nulidad de las células fagocíticas (neutrófilos y monocitos) del cuerpo a la hora de eliminar ciertos microorganismos. Esta enfermedad de inmunodeficiencia primaria acaba provocando en los pacientes una mayor susceptibilidad a sufrir infecciones tanto bacterianas como fúngicas [1], [2], [3].

Actualmente, la EGC tiene una incidencia mundial de 1 por cada 250000 recién nacidos vivos, que pueden llegar a mostrar síntomas desde la etapa postnatal hasta la adulta. Los órganos que estadísticamente se ven más afectados suelen ser la piel, los ganglios linfáticos, el tejido celular subcutáneo, los huesos, los pulmones, el bazo y el hígado [4].

Existen cuatro tipos reconocidos de la enfermedad granulomatosa crónica hasta el momento dependiendo del gen que se ve mutado. Uno de estos tipos muestra una herencia ligada al cromosoma X y los otros tres son de herencia autosómica recesiva [3].

Como es de esperar, una enfermedad tan complicada como resulta la EGC, puede venir acompañada de demás manifestaciones autoinmunes, como pueden serlo el lupus, la sarcoidosis, el síndrome antifosfolipídico o la enfermedad inflamatoria intestinal [4].

Los pacientes con EGC no destacan en cuanto a la afectación de virus como pueden serlo los del resfriado o la gripe, sino que seguirán padeciéndolos con la misma frecuencia y probabilidad que la población general. Como se puede suponer, sí hay que mostrar especial atención a las infecciones bacterianas y fúngicas [3].

Hoy día, a pesar de la profilaxis antibiótica y antifúngica, la morbilidad de esta enfermedad sigue siendo significativa, resultando relativamente habituales las complicaciones infecciosas graves. A fecha del año 2001, la tasa de supervivencia de esta inmunodeficiencia se sitúa en el 50% a la edad de 30 años. A pesar de estos fatídicos datos, continuamente se está investigando para lograr que la tasa de supervivencia aumente año tras año rozando cada vez índices máximos históricos en la lucha contra esta

enfermedad [3].

2. CAUSAS

Como ya se ha mencionado anteriormente, la granulomatosis crónica se caracteriza por la imposibilidad de actuar de los neutrófilos y monocitos del enfermo en el momento de la eliminación de ciertos patógenos. Concretamente, dichas células pueden moverse correctamente e incluso ingerir a los microorganismos de forma normal. El problema se presenta a la hora de destruir a las bacterias y hongos fagocitados, ya que se vuelven incapaces debido al alterado metabolismo del interior de la célula [2].

Los neutrófilos de los enfermos no muestran el aumento del metabolismo oxidativo típico de la fagocitosis debido a que no se encuentra uno de los componentes de la NADPH oxidasa (Figura 1). Esta enzima cataliza la formación de superóxido, que resulta ser el precursor para la generación de compuestos formados a partir del oxígeno [3].

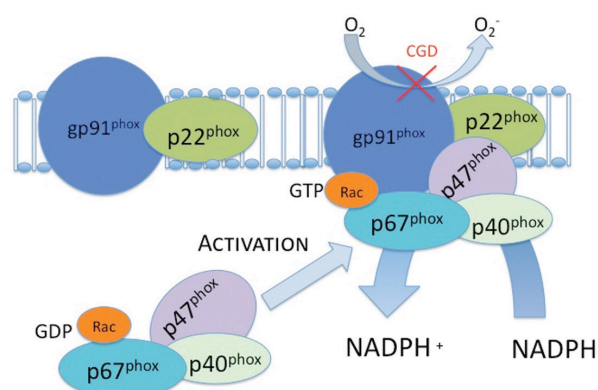


Figura 1. La enzima NADPH oxidasa [3].

El peróxido de oxígeno, además de otros compuestos oxigenados, se produce durante la fagocitosis en los fagocitos sanos y son indispensables para eliminar ciertos hongos y bacterias una vez que se hallan dentro del fagocito [2].

Las células fagocíticas de los afectados por EGC han perdido la capacidad de procesar el oxígeno y crear molé-

culas a partir de él y se obtiene como resultado la característica incapacidad para destruir ciertos microorganismos en esta enfermedad [2].

Pero, ¿por qué hablamos solo de “ciertas” bacterias y hongos? Pues bien, esto se debe a que algunas especies de bacterias, como pueden serlo los neumococos o estreptococos, producen normalmente compuestos oxigenados como el mencionado peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, cuando los fagocitos ingieren este tipo de bacterias, éstas mismas contribuyen a vencer el defecto con su propio peróxido de hidrógeno, brindando al fagocito la oportunidad de destruir correctamente la bacteria [2].

Como ya se ha mencionado con anterioridad, existen cuatro tipos de EGC (Tabla 1). Éstos se distinguen según cuál de las cuatro subunidades de la enzima NADPH oxidasa se ve afectada por una mutación genética:

Gen de EGC	Modo de herencia	Frecuencia	Grupos afectados
gp91phox (CYBB)	Ligada al cromosoma X	65%	Varones
p47phox (NCF-1)	Autosómica recesiva	25%	Ambos sexos
p67phox (NCF-2)	Autosómica recesiva	5%	Ambos sexos
p22phox (CYBA)	Autosómica recesiva	5%	Ambos sexos

Tabla 1. Características de los 4 tipos de EGC [3].

Tal y como se puede apreciar en la tabla, existen dos patrones de transmisión de esta enfermedad. La primera de ellas es heredándola de forma recesiva ligada al cromosoma X. La segunda es heredándola de forma autosómica recesiva. Entender la forma de transmisión de la enfermedad es uno de los factores que más ayuda debido a la aportación de conocimiento que hace sobre la misma [3].

3. SÍNTOMAS

La EGC causa infecciones crónicas y repetitivas, ya que células del sistema inmunitario no llegan a destruir algunos tipos de bacterias y hongos. Principalmente son infecciones cutáneas, que incluyen [3]:

- Ampollas o llagas en el rostro.
- Eccemas.
- Furúnculos llenos de pus.
- Abscesos en el recto.
- Partes del cuerpo que producen calor o dolor cuando se tocan, y a veces se inflaman.

Los síntomas mencionados anteriormente son los primarios y más comunes. A continuación se nombran algunos menos usuales [3]:

- Aumento de la temperatura de 38° o superior.
- Evacuación de vientre líquida y frecuente.
- Inflamación de los ganglios linfáticos del cuello, axilas e ingles.
- Tos convulsiva o dolor del tórax.
- Sudoración nocturna.

- Dolor de cabeza.
- Falta de apetito.
- Disminución de peso.
- Molestias urinarias e intestinales.
- Problemas con el aparato digestivo.
- Neumonía.

4. DIAGNÓSTICO

Para determinar el carácter de la enfermedad es necesario examinar los signos que presenta. Cuando en un ser vivo, de manera constante y significativa se producen infecciones, en la piel, los pulmones o el intestino, provocadas por virus, hongos o bacterias, se puede sospechar de la presencia de la EGC. Si además, estas infecciones son provocadas por microorganismos como *Serratia*, *Nocardia*, *Burkholderia* y *Aspergillus* pueden ser el elemento decisivo para poder diagnosticar la enfermedad [2, 3].

El diagnóstico eficaz se realiza con un estudio detallado de las células fagocíticas del paciente. Se extrae sangre del enfermo con EGC y se aíslan los fagocitos. Se estudian las estructuras y combinaciones químicas de las partes de las células y su forma de metabolizar bien distintas sustancias como el oxígeno y originar compuestos que contienen este elemento. Así como, se comprueba la destreza de los fagocitos de deshacerse de los microorganismos que han ocasionado las infecciones [2].

Las pruebas deben llevarse a cabo en laboratorios especializados en la realización de este análisis médico.

Una vez concluidas las pruebas de la persona afectada, es recomendable efectuar los análisis y asesorar a toda la familia, por la posible repercusión de la enfermedad en otros miembros [2, 3].

5. TRATAMIENTO

Un diagnóstico adelantado de la enfermedad y el uso adecuado de antibióticos favorece significativamente el tratamiento de la EGC. Hacer lo necesario para hallar el origen de la infección es un hecho relevante. Además, conocer la sensibilidad hacia los antibióticos del microorganismo que ha causado la infección, también es determinante [2].

Cuando los antibióticos fracasan y peligra la vida, las transfusiones de granulocitos pueden ser la solución.

Es necesario llevar una medicación diaria y preventiva, ya que las infecciones son muy frecuentes, especialmente cuando el enfermo está en la niñez, se le prescribe el empleo continuado de cotrimoxazol (mezcla de trimetoprima y sulfametoxazol, antibióticos que por su complementariedad suelen utilizarse asociados) que lo protegen anticipadamente de cualquier infección [2].

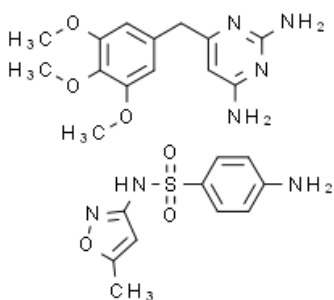


Figura 2. Fórmula química del trimetoprima y el sulfametoxazol, los dos antibióticos que conforman el cotrimoxazol.

El itraconazol, es un antimicótico que suele beneficiar al paciente con EGC. Es empleado en el tratamiento preventivo contra hongos del género *Aspergillus*. Es bastante eficaz, reduciendo las infecciones producidas por hongos [3].

El interferón gamma (IFN- γ) se emplea asimismo para cuidar, de manera preventiva, a enfermos con EGC, quienes con este tratamiento pueden tener menos infecciones, o bien, infecciones menos graves [2].

En la cura de las infecciones agudas es necesario conocer el microorganismo que causa la infección. Teniendo siempre en cuenta la gama de bacterias que son capaces de provocar infecciones en la EGC es recomendable el uso de ciprofloxacino y teicoplanina [3].

Cuando las inflamaciones asociadas a la enfermedad (colitis, gingivitis, neumonía,...) se agravan es necesario el uso de nuevos fármacos. Que se usaran con precaución y bajo la prescripción de especialistas en la materia [3].

El trasplante de células madre puede ser la solución para los pacientes con EGC, pues estas células le proporcionarían durante toda su existencia células con una actividad normal. Los trasplantes de células madre alcanzan hoy en día muy buenos resultados, siempre que el donante de médula ósea sea compatible con el receptor de la misma. Si el patrimonio genético del donante y del receptor son idénticos o bastante parecidos el éxito está garantizado. Si presenta muchas diferencias el injerto será rechazado por el receptor [3].

REFERENCIAS

- [1] Enfermedad Granulomatosa Crónica. Web de la Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001239.htm>
- [2] Enfermedad Granulomatosa Crónica. Web de la Immune Deficiency Foundation. <https://primaryimmune.org/wp-content/uploads/2011/04/Enfermedad-Granulomatosa-Cr%C3%B3nica.pdf>
- [3] "Enfermedad Granulomatosa Crónica. Guía para profesionales médicos." CGD Society. http://www.cgdsociety.org/static/media/up/EGC-Gui%C3%81a_para_profesionales_me%C3%81dicos.pdf
- [4] Marsán Suárez V, Del Valle Pérez LO, Macías Abraham C, Palma Salgado L, García García I, Sánchez Segura M, Arce Hernández AA, Villaescusa Blanco R. "Enfermedad granulomatosa crónica". *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* (2014)

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892014000300011

- [5] Web de la Clínica Dam. <https://www.clinicadam.com/salud/5/001239.html> (Enlace web)



Luna Jiménez Castilla.

Estudiante de 4º de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide.

El fósforo blanco como arma química

María del mar Moreno Romay

Resumen— El fósforo blanco es una sustancia química que se ha estado usando como arma en conflictos bélicos desde la Primera Guerra Mundial, debido a la inestabilidad que presenta y al grave daño que es capaz de producir en las personas. Puesto que no está tipificado en la Ley su prohibición, no deja de usarse como arma y como agente incendiario para provocar pantallas de humo.

Palabras Clave— Fósforo blanco, arma química, conflicto bélico, inestable, inflamable



1. INTRODUCCIÓN

El fósforo blanco es la forma alotrópica más peligrosa del fósforo, superando al fósforo negro y al fósforo rojo.

Se puede decir que es el más inestable e inflamable de los tres y, por ende, el que provoca más daño en las personas. Lo que provoca normalmente son quemaduras de segundo y tercer grado al entrar en contacto con la piel (uso en situaciones de conflictos bélicos), puede llegar a ser cancerígeno y, además, puede dañar el hígado, el corazón y los riñones debido a la absorción en el cuerpo de dicha sustancia. [1]

Debido a su inestabilidad y al daño que es capaz de producir, se ha usado por parte de algunos países en situaciones de conflicto bélico, como fue en la Segunda Guerra Mundial o en la Guerra de Vietnam.

Teniendo en cuenta esto, esta sustancia ha sido calificada por algunas organizaciones como arma química.

2. FÓSFORO BLANCO

2.1. Propiedades del Fósforo blanco

El fósforo blanco es una sustancia muy inestable, que al entrar en contacto con el oxígeno reacciona inmediatamente inflamándose y quemándose, lo que ocasiona una llama verde. Esto se debe a la oxidación que sufre al exponerse al aire, y lo que forma es una mezcla de óxido de fósforo y parte de ozono. Para mantener esta sustancia estable lo que se hace es mantenerlo siempre bajo agua, ya que no reacciona ante ésta y además tampoco es soluble al H₂O. Además, en su manipulación debe ser usado con unas pinzas, ya que, como hemos dicho, al entrar en contacto con la piel provoca serias quemaduras. [2]

El fósforo blanco está compuesto por cuatro átomos de fósforo (P) ordenados tetraédricamente y unidos por enlaces sencillos, por lo que su fórmula molecular es P₄. El pequeño ángulo que forman esos enlaces sencillos es, en parte, el causante de la inestabilidad y el carácter reactivo que presenta esta sustancia (Figura 1). [3]

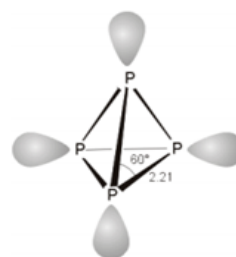


Fig. 1. Forma tetraédrica del fósforo blanco. [3]

Esta sustancia se puede encontrar en rocas de fosfato, en combinación con otros minerales, pero nunca libre por la naturaleza. Además, se puede elaborar de manera artificial usando diversos métodos, entre los cuales se encuentra el calentamiento de tri-fosfato de calcio.

2.2. Historia

Se tiene constancia de que la primera vez que se usó el fósforo como arma fue en la Primera Guerra Mundial. El objetivo de ese uso estaba en que fuera altamente inflamable y que se creara gran cantidad de humo, por lo que se llevó a cabo mediante una disolución con disulfuro de carbono.

Ya durante la Segunda Guerra Mundial el fósforo blanco se utilizó a través de granadas y bombas, con la doble finalidad de crear grandes haces de humo y provocar daños en las personas.

Otros conflictos bélicos en los que se usó el fósforo blanco fue en la Guerra de Corea y en la Guerra de Vietnam, aunque no fue hasta el conflicto Irán-Irak donde se usó como bombardeo aéreo. En Irak, esta sustancia se usó como arma química en 1988 a través de un ataque aéreo, que bombardeó esta ciudad varias veces junto con otras sustancias químicas.

Posteriormente se ha seguido usando esta sustancia química tan peligrosa en diversos conflictos, entre ellos se destaca la guerra de EEUU-Irak, posterior a la ya mencionada, que tuvo lugar concretamente en 2005. El ejército de Estados Unidos usó el fósforo blanco contra Faluya, y se hizo bajo la justificación, según el General Peter Pace, de que se trataba de “una herramienta legítima del ejército”, o que “no es un arma química, es una incendiaria” [4].

Otros conflictos posteriores y más recientes a los anteriormente mencionados donde también se le dio uso a esta sustancia fue en el conflicto de Israel-Gaza (2009) y en la Guerra Civil en el Este de Ucrania (2014).

En el primero, Israel lo utilizó contra Gaza. Aunque los portavoces del ejército lo negaran, había pruebas evidentes de que efectivamente usaron fósforo blanco (Figura 2), entre ellas se destacaron las quemaduras mortales de muchas víctimas. [5]



Fig. 2. Ataque israelí a Gaza, 2009. [6]

En el segundo caso, hay constancia de que se usó fósforo por parte de las fuerzas leales a Kiev contra la población civil, ya que en la zona donde bombardearon no había asentamientos militares y murieron muchos civiles como consecuencia de las heridas provocadas por esta sustancia química. [7]

Actualmente, el fósforo blanco se utiliza en artillería y en los proyectiles de los morteros en guerras.

2.3. Usos

Como se infiere de lo expuesto en el apartado anterior, el principal uso que se le da al fósforo blanco es con fines bélicos. En particular, para crear pantallas de humo o como arma química contra personas.

Con respecto al uso como bombas de humo, se ha considerado como uso militar efectivo puesto que al entrar en contacto la sustancia con el aire reacciona inflamándose y produciendo una gran cortina de humo que, en estos casos, han servido para ocultar movimientos de las tropas militares.

El problema de ello es que con la misma reacción que sufre el fósforo, desprende partículas incandescentes que son las causantes de provocar graves quemaduras en la piel de las personas, y por ello muchas veces se usa con una doble intención de hacer el mayor daño posible.

Hoy en día, el fósforo blanco puede estar al alcance de cualquier persona, ya que, independientemente de que se trate de un mineral o de que se pueda elaborar de manera artificial, es una sustancia química que se puede obtener de formas más sencillas y de forma casera.

Con el avance de las tecnologías, entre ellas la búsqueda de todo tipo de información por internet, se puede encontrar cualquier información acerca de cómo elaborar bombas caseras, a partir de fósforo blanco.

El fósforo es una sustancia que se encuentra, en cantidades pequeñas, diluido en la orina, por lo que, a partir de ésta y mediante algunos procesos químicos como el calentamiento, enfriamiento, filtrado, dilución, etc., se puede llegar a obtener fósforo blanco.



Fig. 3. Hennig Brandt en proceso de obtención de P_4 [8]

El descubrimiento de la extracción del fósforo de la orina se debe al alquimista alemán Hennig Brandt (figura 3), y gracias a él, la obtención de P_4 como tal está al alcance de cualquier persona. [8]

3. LEGISLACIÓN INTERNACIONAL

Según Alberto Estévez, experto en armamento de la ONG en Amnistía Internacional, “no hay ninguna legislación internacional específica que regule el uso de estas armas”, lo que es utilizado por parte de determinados gobiernos para justificar y defender la legalidad de las acciones que llevan a cabo, donde se incluye el uso de esta sustancia como arma militar.

Lo que sí está claro, en cualquier caso, es la prohibición de atacar con cualquier arma química la población civil, según recoge el Protocolo III de la Convención sobre armas convencionales (CCW) de 1980. No obstante, en cualquier conflicto de guerra siempre suele salir perjudicado gran parte de población civil, ya que hablamos de un arma química bastante poderosa y dañina.

En el artículo 35.2 del Convenio de Ginebra se habla de la "prohibición del uso, en los conflictos armados, de armas, proyectiles y material y métodos de guerra cuya naturaleza sea causa de lesiones superfluas o sufrimientos innecesarios", así como en los artículos 48, 51.2, 52.2, 13.2 donde se prohíbe el uso de armas que no distinguen entre la población civil y militar". Por tanto, aunque en ninguna legislación se trate al fósforo blanco como arma química y se prohíba su uso, se debería dar por hecho que es un arma de gran potencial que causa graves lesiones a las personas que alcanza y que, por ende, debería prohibirse su uso tal como ya recogen algunas publicaciones. [9]

4. CONCLUSIONES

Dado que el uso bélico del fósforo blanco no está prohibido legalmente, se usó y sigue usando en conflictos entre Estados. Además, esta sustancia se puede conseguir a partir de unos procesos químicos que puede llevar a cabo cualquier persona con conocimientos básicos sobre el tema. Como se comentó, es una sustancia tan al alcance de todos como es nuestra propia orina. Así, en base a lo expuesto, se concluye la necesidad de una ley que prohíba de manera tajante el uso de fósforo blanco como arma química.

¿Cuántas personas inocentes más deben morir para hacer ver a los altos cargos la gran peligrosidad que presenta este elemento? ¿Cuántos niños más deben ser mutilados, quemados o muertos como consecuencia de las heridas/quemaduras de esta sustancia? ¿Cuándo va a abrir la humanidad los ojos ante tal salvajada?

Las guerras existirán siempre y con ella la muerte de muchas personas, pero la crueldad que se lleve a cabo con ellas, así como el número de bajas de personas, podría reducirse de manera considerable si se tomaran serias medidas contra este tipo de armas químicas ya que, por desgracia, el fósforo blanco no es la única sustancia química usada para realizar armas de tal potencia. Existen todo tipo de armas químicas, nucleares.... de tal magnitud capaz de destruir ciudades enteras, y arrasarse, con ello, la vida de millones de personas. Por ello, es de vital importancia que se haga algo al respecto.

REFERENCIAS

- [1] https://es.wikipedia.org/wiki/f%C3%B3sforo_blanco (Enlace web) (Último acceso 2 de enero de 2016)

- [2] Web del lenntech, universidad Países Bajos. <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/p.htm> (Enlace web) (Último acceso 2 de enero de 2016)
- [3] Web, blog, de elementos semiconductores. <https://kathyc92.wordpress.com/semiconductores/fo-sforo/> (Enlace web) (Último acceso el 20 de enero de 2016)
- [4] https://es.wikipedia.org/wiki/F%C3%B3sforo_blanco (Enlace web) (Último acceso 2 de enero de 2016)
- [5] Amnistía Internacional, "ISRAEL/GAZA. Operación "Plomo fundido" 22 días de muerte y destrucción". Ed. Amnistía Internacional (EDAI), 2009 Valderribas, Madrid, p. 40.
- [6] http://www.mundoarabe.org/ataque_gaza_09.htm (enlace web) (Último acceso el 20 de enero de 2016)
- [7] https://es.wikipedia.org/wiki/F%C3%B3sforo_blanco (Enlace web) (Último acceso 2 de enero de 2016)
- [8] Web full química, recursos para profesores. <http://www.fullquimica.com/2014/09/el-descubrimiento-del-fosforo-la.html> (Enlace web) (Último acceso 2 de enero de 2016)
- [9] http://www.soitu.es/soitu/2009/01/16/actualidad/1232108479_632771.html (Enlace web) (Último acceso 2 de enero de 2016)



María del mar Moreno Romay estudiante en cuarto curso del Grado en Criminología en la Universidad Pablo de Olavide. Perteneciente a la promoción 2012/2016.

La muerte dulce: Intoxicación por monóxido de carbono

Ana Domínguez Luna

Resumen—La intoxicación por monóxido de carbono es una de las principales causas de muerte accidental, ya que debido a sus propiedades es imposible detectar su presencia. Es por ello por lo que es conocida como muerte dulce. En este artículo vamos a explicar cómo se produce dicha intoxicación, así como las fuentes de producción del gas y cómo tratar a las personas intoxicadas.

Palabras Clave— Monóxido de carbono, intoxicación, carboxihemoglobina, oxígeno.

1. INTRODUCCIÓN

El monóxido de carbono (CO) es un gas inodoro, incoloro y no irritante para las vías respiratorias, el cual se introduce en el cuerpo por vía inhalatoria y puede producir una serie de efectos nocivos para la salud que podrían llegar a causar la muerte o generar secuelas neurológicas irreversibles. Está considerado altamente peligroso debido a que sus características lo hacen indetectable para nuestros sentidos.

Este gas se genera cuando se produce una combustión con una pobreza de oxígeno en el aire ambiental, por lo que las habitaciones mal ventiladas en las que se encienden estufas, calefacciones y calentadores de agua son un frecuente origen de intoxicaciones en el hogar.

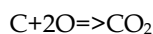
También lo encontramos formando parte del humo de los incendios, junto a partículas también nocivas y otros gases, por lo que es una importante causa de muerte en personas que hayan podido estar expuestas a estos siniestros.

2. EL MONÓXIDO DE CARBONO

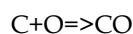
En su estado puro, el monóxido de carbono es un gas incoloro e inodoro, aunque mezclado con otros gases puede adquirir olor. Debido a estas propiedades, es culpable de un elevado número de intoxicaciones accidentales ya que la víctima no puede darse cuenta del peligro al que está siendo sometida.

Las principales fuentes de producción de monóxido de carbono son las combustiones incompletas:

En la combustión de materia orgánica, tiene lugar la producción de anhídrido carbónico, debido a la oxidación del carbono:



Pero a veces, el oxígeno es insuficiente para producir la oxidación completa del carbono (combustión incompleta) por lo que se forma monóxido de carbono:



Otro caso es cuando se da una reducción del anhídrido carbónico que procede de la completa combustión, que pierde un átomo de oxígeno. Esto se produce cuando los gases resultantes de la combustión se encuentran con una superficie fría y amplia.

Este mismo efecto puede darse cuando solo se produce la combustión de una capa interior de combustible. En este caso el CO se produce debido al paso de los gases que se desprenden de dicha capa interior por las capas superiores, que están calientes, pero no en combustión.

Las principales fuentes de monóxido de carbono debido a una combustión incompleta, son las materias carbonosas:

- Combustibles sólidos: madera, leña, carbón vegetal y mineral, serrín etc.
- Combustibles líquidos: hidrocarburos derivados del petróleo como gas natural, gas-oil, fuel-oil, gasolina, gases licuados, etc.
- Explosivos
- Tabaco. Las personas que fuman habitualmente están expuestas a los efectos nocivos de este gas.

3. CAUSAS DE INTOXICACIÓN

Aunque puedan darse distintas causas de intoxicación por este gas, vamos a describir en primer lugar la más importante: la intoxicación accidental.

Se trata de la variedad más frecuente de intoxicación con mucha diferencia respecto las otras variedades.

En relación con la combustión incompleta, se produce cuando los artefactos de calefacción de las viviendas, ya sean estufas, braseros o chimeneas, tengan algún defecto en el tiro; en los calentadores a gas, cuando el mechero no arde correctamente y cuando la toma de aire no es suficiente en los hornillos usados en la cocina; cuando el quemador de las estufas a butano está sucio, la combustión no se realiza adecuadamente por lo que es muy peligroso. También en los incendios, la mayor parte de las víctimas mueren por intoxicación de este gas.

Los hornos de cal y yeso producen la intoxicación de vagabundos que en las noches frías, se refugian a su amparo para combatir el frío. Los gases de escape en los motores de explosión también provocan intoxicaciones accidentales, sobre todo en garajes pequeños que carecen de ventilación, especialmente en época invernal debido a que al encender el automóvil se debe cerrar la toma de aire, por lo que la concentración de CO aumenta en los gases de combustión. Actualmente, los modelos de motor de los vehículos están dotados de starter automáticos, por lo que se han reducido significativamente este tipo de intoxicación accidental por monóxido de carbono. Por último, cabe mencionar que las explosiones producen una elevada concentración de CO por lo que provocan intoxicaciones cuando se producen en espacios cerrados, como por ejemplo las minas.

En un segundo plano, y con mucha menos frecuencia respecto a la causa accidental, tenemos el resto de ellas. Tales como la criminal, la suicida y la profesional, las cuales vamos a señalar brevemente:

Criminal: Este gas es raramente usado para provocar la muerte de personas conscientemente. Sólo se conoce su uso en los llamados "suicidios colectivos" en los que el criminal induce a otras personas a morir intoxicados con este gas. El criminal toma las precauciones necesarias para resistir a la intoxicación, salvando así de la muerte y habiendo provocado la del resto de personas. También es conocida su utilización en algunos campos de concentración nazis durante la Segunda Guerra Mundial.

Suicida: Es una variedad frecuente de intoxicación por este gas. Se procede recurriendo a las fuentes de producción de este gas mencionadas anteriormente, siendo las más frecuentes:

- Los motores de explosión: se deja encendido el motor del automóvil en un recinto cerrado, o bien se procede al aire libre, respirando directamente los gases del tubo de escape.
- Los braseros: se encienden de forma incompleta a propósito y se dejan dentro de una habitación cerrada.

Profesional: Son aquellas intoxicaciones de monóxido de carbono producidas en ambientes laborales y lugares de trabajo. Los profesionales que más riesgo corren son chóferes de turismos y camiones que conducen por un periodo de tiempo prolongado, trabajadores que deben permanecer mucho tiempo en túneles por los que circulan vehículos a motor, bomberos, trabajadores de altos hornos, etc. Así como los profesionales que operan en soldaduras autógenas con soplete oxiacetilénico y en electrólisis a alta temperatura en electrodos de carbón.

4. MECANISMO DE TOXICIDAD

La toxicidad del CO viene dada por la capacidad que tiene esta molécula para unirse a los grupos heme que con-

tienen algunas proteínas. Desde el prisma fisiopatológico, la unión de monóxido de carbono con una de ellas tiene una especial relevancia: con la hemoglobina (Hb), con la cual el CO tiene una afinidad 230 veces superior a la que tiene el oxígeno. Además de esta mayor afinidad, el CO también produce una desviación hacia la izquierda de la curva de disociación del oxígeno con la hemoglobina (figura 1), por lo que el poco oxígeno que la Hb transporta tiene más dificultad para llegar a los tejidos. Esta unión produce la llamada carboxihemoglobina, que es la causante de la hipoxia tisular anóxica, la cual es responsable de la mayor parte de la sintomatología aguda en la intoxicación por este gas. En algunos casos, la muerte se produce por la hipoxia tisular que da como resultado la unión reversible y competitiva del CO al grupo heme de la Hb, de donde desplaza al oxígeno en su mayor parte. Por otra parte, en casos menos graves como para que la muerte del individuo se produzca, la unión de la hemoglobina por el monóxido de carbono empieza a desaparecer paulatinamente una vez retirada la fuente de CO, ya que la eliminación de la carboxihemoglobina es de 320 minutos, aunque puede descender a 80 minutos si se le administra al paciente oxígeno en una concentración del 100%.

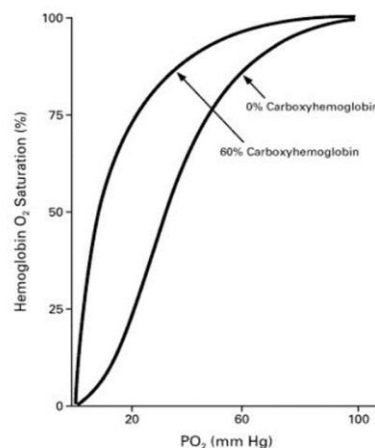


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS CURVAS DE DISOCIACIÓN DE LA HEMOGLOBINA PARA EL OXÍGENO (DERECHA) Y EL MONÓXIDO DE CARBONO (IZQUIERDA).

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En intoxicaciones leves o moderadas los síntomas son muy inespecíficos por lo que es conveniente indagar en la situación contextual del paciente (incendios, estufas en habitaciones mal ventiladas, sistemas de gas anticuados) para situarlo en una intoxicación por CO. En estos casos, es fácil confundir este tipo de intoxicación con una intoxicación alimentaria, cefalea tensional, delirium tremens, parkinsonismo, sobredosis de sedantes-hipnóticos, intoxicación por etanol, migraña, gastroenteritis, etc. Los síntomas más frecuentes son: taquicardia (velocidad excesi-

va del ritmo de los latidos del corazón), taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria por encima de los valores normales), dolor de cabeza, náuseas y vómitos.

En intoxicaciones moderadas, puede aparecer confusión, síncope (pérdida pasajera del conocimiento que va acompañada de una paralización momentánea de los movimientos del corazón y de la respiración y que es debida a una falta de irrigación sanguínea en el cerebro), dolor torácico, disnea (ahogo o dificultad en la respiración), debilidad, taquicardia, taquipnea, rhabdomiolisis (descomposición de las fibras musculares que ocasiona la liberación de los contenidos de dichas fibras en el torrente sanguíneo).

Por último, en caso de intoxicación severa los síntomas son: palpitaciones, arritmias, hipotensión, isquemia miocárdica (reducción del flujo sanguíneo al músculo del corazón por un bloqueo parcial o completo de las arterias de que le suministran sangre), paro cardíaco y/o respiratorio, edema pulmonar no cardiogénico, convulsiones y coma.

5.1. INTOXICACIÓN DE EMBARAZADAS

La fijación del monóxido de carbono a la hemoglobina fetal es mucho mayor debido a que el paso del monóxido por la placenta tiene un mecanismo de difusión simple.

Esto implica que puede tener consecuencias nocivas para el feto a niveles que para cualquier adulto no tendría ninguna consecuencia.

En la mujer embarazada, los picos de CO son más rápidos y su eliminación es más lenta. Los efectos más frecuentes en el feto son: bajo peso, malformaciones, mortinatos y alteraciones neurológicas.

En cualquier momento del embarazo se pueden presentar malformaciones funcionales y poco desarrollo neurológico, pero es en exposiciones tempranas cuando predominan las malformaciones anatómicas.

6. TRATAMIENTO

En primer lugar, se debe retirar al intoxicado de la fuente de CO. Para evitar la contaminación de persona que acude, son necesarias precauciones como el uso de mascarillas y airear el habitáculo. En segundo lugar, se procede a la oxigenación: maniobras de respiración artificial combinada con inhalación de oxígeno. Una forma especialmente útil de administración de oxígeno es la *oxigenoterapia a presión* (hiperbárica): aumenta el oxígeno disuelto en el plasma, que se combina con la hemoglobina 15 veces más de lo normal y es aprovechado directamente por las células. Gracias a este método, en 15 minutos los intoxicados recuperan la conciencia sin lesiones neuroológicas y con 30 minutos de tratamiento es suficientes en la mayor parte de los casos.

Para los casos más graves, son recomendados otro tipo de tratamientos tales como la administración de sustitutivos de la hemoglobina, vasodilatadores y espasmolíticos, así como la hibernación y los tratamientos sintomáticos.

7. CONCLUSIONES

Tras el estudio del monóxido de carbono y su intoxicación, hemos comprobado que se trata de un gas que mata de la forma más indolora posible. Es por ello llamada la muerte dulce.

Este tipo de muerte, ya mencionada en la mitología griega y romana, nos hace pensar que a lo largo de la historia ha sido una de las formas más frecuentes de morir accidentalmente.

El ser humano siempre ha recurrido a la combustión como método para calentarse durante los días fríos y el desconocimiento de este tipo de reacción química, la combustión incompleta, es lo que ha provocado la muerte de tantas personas.

Afortunadamente, hoy en día, tenemos métodos efectivos y seguros para poder prevenir este tipo de intoxicación, aunque cierto es que se siguen produciendo. Por ello podemos considerar que se trata de un peligro latente, silencioso, que puede darse cuando menos lo esperamos y sin darnos cuenta.

La clave de la prevención es la efectiva comprobación de lo que se consideran las fuentes de intoxicación principales, tales como estufas o sistemas de gas, sobre todo las más antiguas, para evitar posibles defectos que den lugar a combustiones incompletas y con ello, a las intoxicaciones.

REFERENCIAS

- [1] http://www.geocities.ws/lucho16/documents/Monoxido_Carbono_L_Vargas.pdf (Último acceso: 20 de noviembre de 2015)
- [2] http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75262003000200009&script=sci_arttext&tlng=e (Último acceso: 20 de noviembre de 2015)
- [3] [http://www.dep4.san.gva.es/contenidos/urg/archivos/guias/2010/Intoxicacion%20por%20monoxido%20de%20carbono%20\(Revision\).pdf](http://www.dep4.san.gva.es/contenidos/urg/archivos/guias/2010/Intoxicacion%20por%20monoxido%20de%20carbono%20(Revision).pdf) (Último acceso: 20 de noviembre de 2015)
- [4] http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-76062007000100007 (Último acceso: 7 de noviembre de 2015)
- [5] <http://www.metrogas.com.ar/consejosmonoxido/pdf/monoxido.pdf> (Último acceso: 20 de noviembre de 2015)
- [6] Tema 3 Química Forense, Grado de Criminología, Universidad Pablo de Olavide.
- [7] J.A. Gisbert Calabuig, Medicina Legal y Toxicología, España: Elsevier Mosby, pp. 829-835



Ana Domínguez Luna. Estudiante del doble grado en Derecho y Criminología en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Producción de biodiesel a partir de algas

Elena Torelló Fernández

Resumen—La gran cantidad de problemas ambientales junto con el evidente agotamiento de petróleo provocan la necesidad de desarrollar fuentes renovables de energía. Las algas podrían ser una alternativa para la obtención de combustible, sustituyendo de esta manera el uso de combustibles fósiles.

Palabras Claves— Biodiesel, Renovable, Algas

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existen diversos problemas relacionados con los combustibles fósiles que nos afectan a toda la humanidad. Consumimos a un nivel superior al que deberíamos, por lo que es evidente el agotamiento de petróleo y consecuentemente el aumento de su precio. Por otro lado, se ha producido un incremento progresivo de los problemas medioambientales asociados al uso excesivo de petróleo, lo que contribuye de forma importante al aumento de emisiones de gases de efecto invernadero y al calentamiento global. Por todo esto, se hace patente la necesidad de usar fuentes de energía renovables y menos contaminantes para la obtención de energía [1]. El uso de algas para obtener biodiesel parece ser una buena opción para sustituir a los combustibles fósiles. Esta tecnología presenta multitud de ventajas por lo que desde hace unos años despierta el interés de muchos investigadores [2].

2. BIOCOMBUSTIBLES Y BIODIESEL

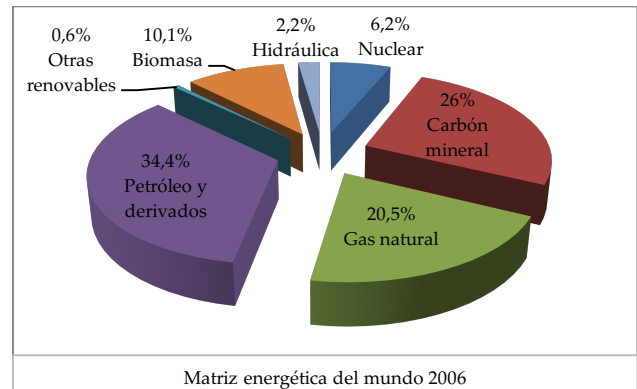
Los biocombustibles que derivan de la biomasa son combustibles generados a partir de procesos biológicos. Por el contrario, los combustibles fósiles provienen de la energía almacenada durante largos periodos de tiempo en los restos fósiles [3].

El biodiesel es un biocombustible líquido que se obtiene a partir de lípidos naturales vegetales o grasas animales [4]. Estos pueden ser utilizados como sustitutos del gasóleo. Para producir el biodiesel, el aceite se extrae de la semilla cultivada; posteriormente es refinado y sometido a la transesterificación, mediante la combinación del aceite con un alcohol ligero, normalmente metanol. Como subproducto de la reacción química se genera la glicerina, que se emplea como materia prima de diferentes industrias, como la cosmética.

El biodiesel puede usarse en su forma pura (100% biodiesel) o mezclado en cualquier proporción con diesel regular para su uso en motores de ignición a compresión [5].

3. CONTEXTO GLOBAL

La crisis del petróleo es de carácter recurrente, desde la primera gran crisis del año 1973 hasta en los últimos años, en los que el precio del petróleo ha sido más sensible a los conflictos políticos del Oriente Medio y a las acciones de los agentes especulativos del mercado petrolero.



Gráfica 1. Porcentajes de las fuentes de energía empleada en el mundo (2006) [6].

En las últimas décadas la energía mundial ha sufrido grandes transformaciones lo que ha llevado a la necesidad de promover nuevas fuentes de energía que puedan reemplazar los combustibles fósiles. Sin embargo, actualmente las fuentes de energía no renovables representan más del 80% de la energía mundial (Gráfica 1) [6]. Es necesario el crecimiento de las fuentes renovables debido al progresivo agotamiento de los combustibles fósiles en varias regiones, al elevado consumo en los países desarrollados y al aumento de su demanda en muchos países.

4. ALGAS COMO MATERIA ALTERNATIVA AL PETRÓLEO

Las algas son organismos con clorofila que realizan fotosíntesis, crean materia orgánica a partir del CO₂ utilizando la energía procedente del sol.

Las microalgas son la forma más primitiva de las plantas superiores. Si bien el mecanismo de la fotosíntesis en las microalgas es similar a la de las plantas superiores, las microalgas, debido a su estructura celular sencilla, son generalmente más eficientes para convertir la energía solar en lípidos, el componente base que será después transformado en biocombustible.

Existen aproximadamente unas 30.000 especies diferentes de algas que pueden ser desde microscópicas hasta gigantes, las hay de agua salada y de agua dulce y en cuanto a su color pueden ser rojas, verdes o pardas.

Están compuestas por ácidos nucleicos, proteínas, ácidos grasos y carbohidratos. Los ácidos grasos se transforman en biodiesel y según el tipo de alga presentan más o menos concentración de ácidos grasos. Por este motivo,

aquellas algas que se puedan cultivar con facilidad y que presenten gran cantidad de ácidos grasos serán las más idóneas para la obtención de biodiesel. En este sentido, las algas verdes (Chlorophyceae) y las algas diatomeas (Bacillariophyceae) son un ejemplo de las algas más recomendadas para esta tecnología [7].

5. CULTIVO DE ALGAS PARA PRODUCIR BIODIESEL

Los tres componentes fundamentales para el crecimiento de las algas son el CO₂, la luz solar y el agua.

Existen dos tipos de sistemas para cultivar algas:

5.1. SISTEMAS ABIERTOS

Las algas pueden cultivarse en lagos o estanques. Estos sistemas son muy económicos y sencillos de construir. Sin embargo existe una gran probabilidad de ser contaminados e invadidos por otras algas. Además, al estar al descubierto no se pueden controlar las condiciones ambientales (agua, intensidad de la luz, CO₂, pH, etc) por lo tanto, el crecimiento de las algas dependerá de las condiciones del medio.

5.2 SISTEMAS CERRADOS

Estos sistemas solucionan los problemas patentes de los sistemas abiertos permitiendo una mayor productividad frente a estos. Permiten el mantenimiento de las condiciones ideales para su crecimiento y con todo esto se consigue una mayor eficiencia de la fijación del CO₂. Este tipo de sistemas ofrece una menor posibilidad de contaminar los cultivos de algas con la presencia indeseada de otras especies. Además, es posible el control de la temperatura, así como el incremento de CO₂ en el ambiente, lo que implica un aumento del crecimiento de las algas [7].

Los estanques es un ejemplo de sistemas cerrados que tienen mecanismos para mantener en movimiento las algas con el fin de que todas reciban nutrientes y luz de forma equitativa. Otros ejemplos de sistemas cerrados serían los invernaderos de algas y los fotobioreactores, estos últimos son muy caros pero poseen un elevado rendimiento en la producción de aceite de algas [6].

6. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITES Y PRODUCCIÓN DE BIODIESEL

Para la producción de biodiesel son necesarios una serie de procesos. En primer lugar, se extraen las algas de su medio de cultivo mediante procesos de separación. En segundo lugar, se extrae el aceite de las algas. El método más común para la extracción de aceites usa el hexano. Se trata de un método bastante económico que consiste en extraer el aceite con una prensa y con el disolvente hexano se extrae el contenido sobrante del alga. Por último, el aceite y el ciclohexano se separan por destilación. Tras la extracción de aceites tendría lugar el proceso de transesterificación, este proceso es de vital importancia ya que soluciona los problemas de viscosidad del aceite. En este sentido, hay que tener en cuenta que la viscosidad es un parámetro importante de cualquier aceite. Es una medida de la resistencia del aceite a fluir. La viscosidad del aceite debe ser la apropiada para cada temperatura ambiente. Si el aceite es demasiado viscoso cuando el motor está frío, no circulará por su interior. Y si se hace muy poco viscoso

cuando está caliente, no proporcionará la protección adecuada a las piezas del motor. Por lo tanto, optimizar la viscosidad de un aceite contribuye a maximizar la eficiencia energética al tiempo que evita el desgaste de los componentes [8].

Los aceites están compuestos principalmente por triglicéridos, estos están formados por una molécula de glicerina con tres grupos hidroxilos unidos a tres cadenas de ácidos grasos, liberándose agua, es el denominado proceso de esterificación.

El proceso de transesterificación consiste en transformar un triglicérido en metiléster que es el biodiesel, mediante la presencia de un alcohol y un catalizador (base o ácido), obteniéndose glicerina como subproducto (Figura 1). La glicerina es la principal causante de la viscosidad en los aceites, por lo tanto eliminando la glicerina, nos quedaría finalmente biodiesel con características muy semejantes al petróleo actual [6].

Una alternativa para aumentar la productividad de biodiesel es el uso de la enzima Acetil-CoA carboxilasa. Dicha enzima puede estar implicada en la producción de ácidos grasos. Mediante ingeniería genética podría manipularse el gen que codifica esta enzima y de esta forma se incrementaría la producción de lípidos. La unión de esta enzima a la biotina regula la biosíntesis de ácidos grasos, dando como resultado un aumento en la producción de aceites en algas y por consiguiente un aumento de la cantidad de biodiesel [6].

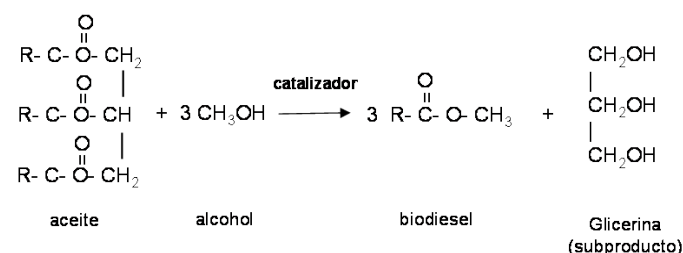


Figura 1. Esquema básico del proceso de transesterificación [6].

7. VENTAJAS DEL BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE ALGAS

Las algas son un recurso renovable, poseen un alto rendimiento y bajo coste de producción. Al ser un recurso inagotable, son excelentes sustitutos de combustibles producidos a través del petróleo, el cual se está agotando. Además, el biodiesel obtenido a partir de algas resulta totalmente compatible con los motores existentes [7].

Ventajas Ambientales

El biodiesel es biodegradable por naturaleza (aunque los aditivos pueden reducir su biodegradabilidad), a diferencia del diesel fósil. El biodiesel se degrada de 4 a 5 veces más rápido y no contamina las aguas superficiales ni los acuíferos. Es decir, una avería en la cadena productiva no da lugar a efectos desastrosos en el medio ambiente. Los derrames de este combustible en ríos o mares resultan menos contaminantes para la fauna y la flora que los combustibles fósiles.

Este biocombustible, prácticamente no contiene azufre, por lo que no genera SO₂, un gas que contribuye a la contaminación ambiental. Su combustión genera menos elementos nocivos que los combustibles tradicionales [6]. El biodiesel supone un ahorro de un 25% a un 80% de las emisiones de CO₂ producidas por los combustibles deri-

vados del petróleo, disminuyendo de esta forma la emisión de gases de efecto invernadero [6].

Aunque su combustión produce CO₂, este se compensa con el CO₂ que las algas absorbieron durante su crecimiento [3].

Ventajas Energéticas

El biodiesel es una fuente de energía renovable que reduce la dependencia de fuentes no renovables de energía, como puede ser el petróleo, el gas natural y el carbón. Además, asegura el abastecimiento energético.

Ventajas Económicas

El uso masivo de biodiesel en el transporte puede estimular un desarrollo agrícola alternativo, ya que demandaría un producto de mayor valor agregado.

El biodiesel permite al productor agrícola autoabastecerse de combustible. Su producción promueve la inclusión social de los habitantes menos favorecidos del sector rural, debido a que no requiere altos niveles de inversión.

El biodiesel posee una mayor eficiencia productiva, ya que se podrían utilizar los excedentes de la producción agrícola y el resto de los residuos orgánicos.

Además, disminuiría la necesidad de importación de petróleo, mejorando de esta manera el saldo de la balanza comercial y ocasionando por lo tanto un ahorro de divisas.

CULTIVOS	RENDIMIENTO DE BIOCOMBUSTIBLES EN LITROS POR HECTÁREAS (L/HA)
Algodón	325
Soja	446
Sésamo	696
Arroz	828
Girasol	952
Amapola	1163
Nueces pecanas	1791
Jojoba	1892
Palta	2638
Coco	2689
Caña de azúcar	8931
Algas	95000

Tabla 1. Rendimiento de biocombustibles (L/Ha) obtenidos a partir de vegetales [7].

Otra ventaja sería la creación de nuevos puestos de trabajos a lo largo de toda la cadena de producción del biodiesel.

En comparación con los vegetales terrestres, las algas pueden cultivarse en ciclos más cortos y son capaces de producir 30 veces más lípidos que los vegetales terrestres, consiguiendo de esta forma un mayor rendimiento de combustibles (Tabla 1). Además, no es necesario el uso de tierras fértiles, dejando estas disponibles para la agricultura alimentaria. Por otra parte, se reduce el uso de plaguicidas pesticidas [7].

Otras ventajas

El biodiesel tiene mayor lubricidad que el diesel de origen fósil, por lo que extiende la vida útil de los motores.

Es el único combustible alternativo que funciona en cualquier motor diesel convencional, sin ser necesaria ninguna modificación significativa.

Es más seguro de transportar, almacenar y manipular, ya que tiene un punto de inflamación significativamente más alto que el diesel.

Por su poder de solvente, el biodiesel produce la limpieza de los tanques usados por el diesel de petróleo.

El número de cetano tiende a ser más alto, por lo cual el proceso de arranque del motor es más suave. Además, el biodiesel quema mejor, reduciendo el humo visible en el arranque del vehículo en un 30% [6].

8. DESVENTAJAS DEL BIODIESEL OBTENIDO A PARTIR DE ALGAS

El biodiesel de baja calidad (con un bajo número de cetano) puede incrementar las emisiones de NO_x (óxidos de nitrógeno), pero si el número de cetano, es mayor que 68, las emisiones de NO_x serían iguales o menores que las provenientes del diésel fósil.

Los costes de la materia prima son elevados y guardan relación con el precio internacional del petróleo. Dichos costes representan el 70% de los costes totales del biodiesel, por lo que este actualmente es un producto relativamente costoso.

El biodiesel presenta problemas de fluidez y congelamiento a bajas temperatura (<0°C), especialmente el que se produce de palma africana.

Por su alto poder solvente, se recomienda almacenar el biodiesel en tanques limpios; si esto no se hace, los motores podrían ser contaminados con impurezas provenientes de los tanques.

El contenido energético del biodiesel es algo menor que el de diesel (12% menor en peso u 8% en volumen), por lo que su consumo es ligeramente mayor.

La mayor viscosidad del biodiesel en relación al diesel, puede causar problemas en la inyección del combustible [6].

9. CONCLUSIONES

La reserva energética de la humanidad podría encontrarse en el océano. El biodiesel obtenido a partir de algas podría ser la solución para satisfacer las demandas futuras de energía; así como, para los problemas ambientales. Esta novedosa tecnología presenta importantes ventajas por lo que resulta muy interesante para los investigadores. El cultivo de algas tiene además efectos beneficiosos en el medio ambiente, como por ejemplo la captura de CO₂ industrial. Aunque actualmente está aumentando la investigación acerca de las algas, este es un grupo poco estudiado con muchos beneficios por descubrir.

REFERENCIAS

- [1] <https://es.wikipedia.org/wiki/Biodi%C3%A9sel>http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Biodiesel.pdf
- [2] <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2010/10/08/130989>
- [3] <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2010/10/08/130989>
- [4] <https://es.wikipedia.org/wiki/Biodi%C3%A9sel>
- [5] <http://waste.ideal.es/biodiesel.htm>
- [6] <http://www.biodiesel.com.ar/download/biocombustibles-liquidos-en-uruguay-perspectivas-generales-de-desarrollo.pdf>
- [7] <https://elodiebrans.wordpress.com/2013/09/04/biocombustibles-de-microalgas-ii/>
- [8] <http://www.shell.es/products-services/on-the-road/consumer-lubricants-tpkg/right-oil.html>



Elena Torelló Fernández: Estudiante de 4º curso del Grado de Ciencias Ambientales en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

Técnica de estimación de Puntos de Casos de Uso

Susana de la Calle Iglesias

Resumen—La técnica de estimación de Puntos de Casos de uso es un método de estimación de esfuerzo para proyectos de software, a partir de sus casos de uso. El método utiliza unos actores y casos de uso relevados para calcular el esfuerzo que significará desarrollarlos. A los casos de uso se les asigna una complejidad basada en transacciones, entendidas como una interacción entre el usuario y el sistema, mientras que a los actores se les asigna una complejidad basada en su tipo, es decir, si son interfaces con usuarios u otros sistemas. También se utilizan factores de entorno y de complejidad técnica para ajustar el resultado.

Palabras Claves— Análisis, Casos de Uso, Esfuerzo, Actor, Sistema.



1. INTRODUCCIÓN

El proceso de gestión de proyectos de software comienza con un conjunto de actividades que se denominan *planificación del proyecto*. Las metodologías de desarrollo de sistemas han evolucionado, desde los antiguos sistemas por lotes, la programación estructurada, hasta la orientación a objetos, pero las técnicas de estimación no lo han hecho. Existen técnicas adecuadas que nos permiten realizar estimaciones, como la técnica de **estimación de Puntos de Casos de Uso**, la cual se basa en metodologías orientadas a objetos, específicamente en el *modelo de casos de uso*.

Los casos de uso son una técnica para especificar el comportamiento de un sistema.

Todo sistema de software ofrece a su entorno —aquellos que lo usan— una serie de servicios. Un caso de uso es una forma de expresar cómo alguien o algo externo a un sistema lo usa. Cuando se dice “alguien o algo” se hace referencia a que los sistemas son usados no sólo por personas, sino también por otros sistemas de hardware y software.

2. PUNTOS DE CASOS DE USO

2.1. Puntos de casos de uso sin ajustar

Al inicio de un proyecto de software, cuando apenas se conocen los casos de uso y sus actores asociados, se puede proyectar una breve descripción de cada caso de uso basada en la funcionalidad que éste debe brindar. Los puntos de casos de uso sin ajustar (UUCP), nos pueden servir para precisar la dificultad de los casos de uso e interfaces, teniendo en cuenta los pesos de los actores (UAW) y los pesos de los casos de uso (UUCW).

$$UUCP = UAW + UUCW$$

Aplicando el análisis de puntos de función a estos casos

de uso, se puede obtener una estimación trivial del tamaño y a partir de ella una estimación de esfuerzo.

2.2. Puntos de casos de uso ajustados

Para calcular los puntos de casos de uso ajustados, es necesario haber calculado previamente los puntos de casos de uso sin ajustar (UUCP), los factores técnicos (TCF) y los factores ambientales (EF).

$$UCP = UUCP \times TCF \times EF$$

3. ESTIMACIÓN

3.1. Factor de peso de los casos de uso sin ajustar (UUCW)

El nivel de complejidad se puede determinar mediante dos métodos:

Basado en transacciones: Tiene en cuenta el número de transacciones que se pueden realizar en un caso de uso y lo evalúa según la tabla 1.

TABLA 1

Tipo de caso de uso	Descripción	Factor
Simple	3 transacciones o menos	5
Medio	4 a 7 transacciones	10
Complejo	Más de 7 transacciones	15

Basado en clases de análisis: Tiene en cuenta el número de clases que tiene un caso de uso y lo evalúa según la tabla 2.

TABLA 2

Tipo de caso de uso	Descripción	Factor
Simple	Menos de 5 clases	5
Medio	5 a 10 clases	10
Complejo	Más de 10 clases	15

Independientemente del camino utilizado para determinar el tipo de caso de uso, la fórmula es:

$$UUCW = \sum (\text{CantidadDeUnTipoDeCasoUso} * \text{Factor})$$

Para realizar esta operación se debe contar el número de casos de uso de cada tipo presentes en el Sistema, sustituirlo en el campo **CantidadDeUnTipoDeCasoUso** y multiplicarlo por el valor que tenga su factor correspondiente; obteniendo así el resultado por cada tipo de caso de uso. Una vez hecho esto, se suma cada producto para calcular el factor de peso de los casos de uso sin ajustar (UUCW).

3.2. Factor de peso de los actores sin ajustar (UAW)

Consiste en la evaluación de la complejidad de los actores con los que tendrá que interactuar el sistema. Se muestra en la tabla 3.

TABLA 3

Tipo de actor	Descripción	Factor
Simple	Sistema que interactúa con el sistema a desarrollar mediante una interfaz de programación (API).	1
Medio	Sistema interactuando a través de un protocolo (ej. TCP/IP) o una persona interactuando a través de una interfaz en modo texto.	2
Complejo	Una persona que interactúa con el sistema mediante una interfaz gráfica (GUI).	3

La fórmula es la siguiente:

$$UAW = \sum (\text{cantidadDeUnTipoDeActor} * \text{Factor})$$

Para realizar esta operación sería necesario contar cuántos actores de cada tipo existen en el sistema, este representaría el valor **cantidadDeUnTipoDeActor** en la fórmula y se tiene que multiplicar por el valor que tenga su factor correspondiente, para obtener el resultado por cada tipo de actor. Una vez terminado esto se procede a sumar cada producto para obtener el UAW.

3.3. Factores de complejidad técnica (TCF)

Este se compone de 13 puntos que evalúan la complejidad de los módulos del sistema que se desarrolla. Los ítems se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Factor	Descripción	Peso
T1	Sistema distribuido.	2
T2	Objetivos de performance o tiempo de respuesta.	1
T3	Eficiencia del usuario final.	1
T4	Procesamiento interno complejo.	1
T5	El código debe ser reutilizable.	1
T6	Facilidad de instalación.	0.5
T7	Facilidad de uso.	0.5
T8	Portabilidad.	2
T9	Facilidad de cambio.	1
T10	Concurrencia.	1
T11	Incluye objetivos especiales de seguridad.	1
T12	Provee acceso directo a terceras partes.	1
T13	Se requiere facilidades especiales de entrenamiento a usuario.	1

Estos factores se evalúan de 0 a 2 puntos si son irrelevantes, de 3 a 4 si son medios o 5 si son esenciales.

Las fórmulas para este punto son:

$$TFactor = \sum (\text{Valor} * \text{Peso})$$

$$TCF = 0.6 + (0.01 * TFactor)$$

Para realizar este cálculo se le asigna un valor a cada factor, y se multiplica y se suma cada producto para obtener el TFactor. Una vez obtenido, se halla el TCF multiplicando por 0.01 y sumando el resultado a 0.6.

3.4. Los factores del entorno (EF)

Después de tener en cuenta los factores técnicos para el ajuste de los Puntos de Caso de Uso, también hay que contabilizar la complejidad de los factores del entorno. Como en el caso anterior a cada factor de entorno le damos un valor entre 0 y 5 dependiendo de la influencia del proyecto.

A continuación, se muestra en la tabla 6 un resumen con distintos pesos asignados a diferentes factores de entorno.

TABLA 6

Factor	Descripción	Peso
R1	Familiaridad con RUP	1.5
R2	Experiencia en la aplicación	0.5
R3	Experiencia con lenguajes orientados a objetos	1
R4	Capacidades de análisis	0.5
R5	Motivación	1
R6	Requisitos estables	2
R7	Trabajadores a tiempo parcial	-1
R8	Dificultad del lenguaje de programación	2

El factor del entorno del proyecto se calcula multiplicando el valor de cada factor por su peso, y luego sumando cada producto para conseguir el llamado EFactor (EF): **EFactor = Sum (Valor * Peso)**

Una vez que hemos obtenido el EFactor, se obtiene el factor del entorno total con la siguiente fórmula:

$$EF = 1.4 + (-0.03 * EFactor)$$

4. CÁLCULOS DE LOS PUNTOS DE CASOS DE USO AJUSTADOS (UCP)

4.1. Esfuerzo

Mediante la fórmula de los puntos de casos de uso ajustados, se consigue una estimación inicial del tamaño del proyecto y no del esfuerzo.

Una vez obtenido el tamaño, se puede obtener el esfuerzo utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Esfuerzo} = \text{UCP} * \text{Factor de Productividad}$$

Para tener una estimación del esfuerzo se propone usar un factor de ajuste, llamado Factor de Productividad; y para hallarlo, se sugiere usar una estimación de 20 personas/hora por cada Punto de Caso de Uso (UCP).

Esta estimación solo hace referencia a las horas/hombre invertidas en el desarrollo de una funcionalidad especificada en los casos de uso.

5. VENTAJAS E INCONVENIENTES

5.1. Ventajas

Utilizando el método de Puntos de Casos de Uso automatizamos la estimación. Algunas herramientas de gestión de casos de uso contarán automáticamente el valor de los puntos de casos de uso en el sistema. Esto supone un gran ahorro de tiempo al equipo.

Es posible establecer un promedio de organización en el tiempo de implementación por Puntos de Casos de Uso; siendo útil en la predicción de futuros horarios.

Otra ventaja es que esta técnica es una medida fiable en cuanto a estimar el tamaño de un proyecto; debido a que los enfoques de la estimación nos permiten separar la estimación del tamaño de la aplicación de la estimación del esfuerzo. Por ello, el tamaño de una aplicación será independiente la habilidad, de la experiencia del equipo que lo implementa.

Finalmente, es un método versátil y extensible a variedad de proyectos de desarrollo. Pues es fácil de aprender y rápido de aplicar.

4.2. Inconvenientes

La desventaja principal es que no se puede llegar a calcular el esfuerzo que supone escribir los casos de usos. También es importante tener en cuenta, que si en el proyecto se tienen ya redactados todos los casos de uso antes del desarrollo y todas las estimaciones hechas, se reduce la posibilidad de que estos se adapten, y exista

así un aprendizaje basado en el software de desarrollo. En consecuencia, cualquier adaptación podría suponer volver a realizar una estimación.

Dicha técnica, no es muy útil en el trabajo diario, ya que está enfocada únicamente a la fase de codificación de un proyecto.

Para hacer una buena estimación, es necesario que todos los casos de uso estén detallados al mismo nivel, y si son varios los autores de la redacción, posiblemente el nivel de detalle reflejado en cada caso de uso varíe bastante, y por consiguiente perjudique la estimación.

6. CONCLUSIONES

La técnica de Puntos de casos de uso tiene la limitación de que sólo se debe de aplicar en proyectos softwares donde los casos de uso son necesarios.

La estimación obtenida nos da una medida fiable en cuanto al tamaño de un proyecto software, sin embargo, a su vez es susceptible de error en cuanto al tiempo y esfuerzo necesario en el desarrollo.

Por último, destacar que la estimación obtenida se aplica solamente al esfuerzo requerido para la fase de codificación del proyecto, siendo necesario aplicar otros ajustes con el fin de obtener el esfuerzo de todo el ciclo de vida del proyecto.

Sería bueno para un jefe de proyecto conocer esta técnica de estimación como técnica que tiene el potencial de producir resultados fiables. La técnica de Puntos de Casos de Uso nos ofrece una metodología bastante aceptable y adecuada para las fases de codificación de proyectos de TI.

REFERENCIAS

- [1] Kerner, Gustav. Metrics for Objectory. Diploma Thesis, University of Linköping, Sweden
- [2] Applying uses cases: A practical guide. Addison-Wesley
- [3] Estimating object-oriented software projects with use cases (Kirsten Ribu)
- [4] https://es.wikipedia.org/wiki/puntos_de_caso_de_uso
- [5] <http://www.monografias.com/trabajos87/estimacion-software-basada-puntos/estimacion-software-basada-puntos.shtml>
- [6] Estimación de proyectos de software con puntos de casos de uso (Valero Orea, Sergio)
- [7] El método de los puntos caso de uso (Maria Del Carmen García y Javier Garzás)
- [8] Casos de uso - un método práctico para explorar requerimientos (Santiago Ceria)
- [9] Estimating with use case points (Mike Cohn)



Susana de la Calle Iglesias

Estudiante de tercer curso del grado en Ingeniería informática de Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

Patrones de Diseño

Puiu Ionut Cosmin

Resumen— Los patrones de diseño son soluciones para problemas típicos y recurrentes que nos podemos encontrar a la hora de desarrollar una aplicación. Podemos agrupar estos patrones de diseño en según su propósito y tenemos que hay 3 tipos de patrones de diseño: patrones creacionales, patrones de comportamiento y patrones estructurales. En el artículo explicamos en detalles que son y cómo influyen en el desarrollo de aplicaciones.

Palabras Claves— Desarrollo de aplicaciones, patrones de diseño, patrones creacionales, patrones de comportamiento, patrones estructurales, Abstract Factory, Factory Method, Prototype, Singleton, Command, Iterator, Observer, Strategy, Adapter, Composite, Decorador, Proxy.



1. INTRODUCCIÓN

Si eres un buen programador seguro que has oído hablar de los patrones de diseño. Es posible incluso, que ya los estés utilizando en tus aplicaciones. Los patrones de diseño son una herramienta muy útil. Cualquier programador debería conocer, por lo menos, los patrones más utilizados. Y es que tenerlos en nuestra caja de herramientas nos puede ahorrar muchos dolores de cabeza.

Los patrones de diseño son soluciones para problemas típicos y recurrentes que nos podemos encontrar a la hora de desarrollar una aplicación.

En este artículo vamos a conocer una agrupación general de los patrones de diseño y los patrones creacionales de comportamiento y estructurales específicos y que más se utilizan.

2. TIPOS DE PATRONES

Existen diversas maneras de agrupar los patrones de diseño. Quizá la más extendida es agruparlos según su propósito.

En este caso tendríamos las siguientes categorías:

- a) Patrones creaciones: utilizados para instanciar objetos y así separar la implementación del cliente de los objetos que se utilizan. Con ellos intentamos separar la lógica de creación de objetos y encapsularla.
- b) Patrones de comportamiento: se utilizan a la hora de definir como las clases y objetos interaccionan entre ellos.
- c) Patrones estructurales: utilizados para crear clases u objetos que están incluidos dentro de estructuras más complejas.

A continuación vamos a ver más en detalle cada uno de las categorías de patrones que hay y algunos patrones específicos de cada una de las categorías de patrones que hay.

3. PATRONES CREACIONALES

Los patrones de diseño software de creación proporcionan ayuda a la hora de crear objetos desde el punto de

vista de proporcionar un apoyo en la toma de decisiones, incluso cuando esta forma de decisiones sea de forma dinámica.

Los patrones de creación más habituales son:

- **Abstract Factory:** nos encontramos frente un problema en el que debemos crear diferentes objetos, todos pertenecientes a la misma familia, como puede ser el sistema de librerías necesarias para crear interfaces gráficas. Visto solo podríamos decir que lo que intenta solucionar el patrón de diseño software de creación Abstract Factory es crear diferentes familias de objetos. El patrón Abstract Factory se recomienda cuando se atisba la inclusión de nuevas familias de productos en un futuro.
- **Factory Method:** este patrón de diseño software de creación consiste en utilizar una clase constructora abstracta (similar al concepto del patrón Abstract Factory) con unos métodos definidos y otros abstractos dedicados a la construcción de objeto de un subtipo determinado.
- **Prototype:** el patrón de diseño de software de creación Prototype, sirve para crear un duplicado de un objeto, clonando, para ello, una instancia de ese objeto que ya haya sido creado. Para ello, el patrón tiene que especificar el tipo de objeto que quiere clonar, creando así un 'prototipo' de esta instancia. Este tipo o clase de objetos deberá contener en su interfaz el procedimiento que permite solicitar esa copia, siendo desarrollado luego por las clases concretas del patrón que desean crear ese clon.
- **Singleton:** el patrón de diseño de software de creación Singleton busca restringir la creación de objetos pertenecientes a una clase o el valor de un tipo a un único objeto. Su intención es garantizar que una clase solo sea instanciada una vez y, además, proporcionar un único punto de acceso global a la misma. Esto lo consigue gracias a que es la propia clase la responsable de crear esa única instancia y a que se permite el acceso global a dicha instancia mediante un método de clase.

4. PATRONES DE COMPORTAMIENTO

Los patrones de diseño software de comportamiento son aquellos que están relacionados con algoritmos y con la asignación de responsabilidades a los objetos.

Describen no solamente patrones de objetos, o clases, sino que también engloban patrones de comunicación entre ellos.

La variación de la encapsulación es la base de muchos patrones de comportamiento. Cuando un aspecto de un programa cambia frecuentemente estos patrones trabajan con un objeto que encapsula dicho aspecto, teniendo que definir por tanto, una clase abstracta que describe la encapsulación del objeto.

Los patrones de comportamiento más habituales son:

- **Command:** este es un patrón de diseño de software de comportamiento permite realizar una operación sobre un objeto sin conocer realmente las instrucciones de esta operación ni el receptor real de la misma. Esto se consigue encapsulando la petición como si fuera a un objeto, con lo que además se facilita la parametrización de los métodos.

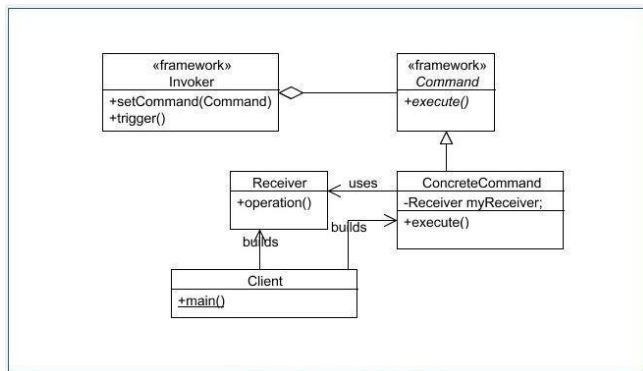


Fig. 2. Diagrama de clases general de este patrón de comportamiento

- **Iterator:** este es un patrón de diseño de software de comportamiento es uno de los mayores exponentes de los patrones de comportamiento. Presenta la interfaz que declara los métodos necesarios para acceder, de forma secuencial a los objetos de una colección. El iterator cubre la necesidad de acceder a los elementos de un contenedor de objetos sin tener que trabajar con su estructura interna. Además, es posible que se necesite más de una forma de recorrer la estructura siendo para ellos necesario crear modificaciones en la clase. Mediante el uso del patrón se añaden métodos que permiten recórrala sin referenciar su representación, por lo que la responsabilidad del recorrido se traslada a un objeto iterator.

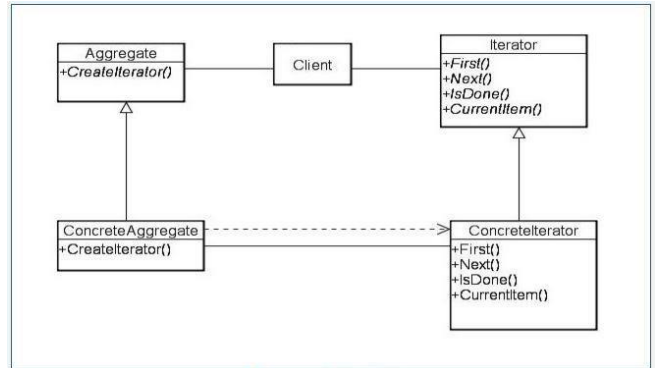


Fig. 2. Diagrama de clases general de este patrón de comportamiento

- **Observer:** este es un patrón de diseño de software de comportamiento define una interacción entre objetos, de manera que cuando uno de los cambie su estado el Observer se encarga de notificar este cambio a los demás.

Por tanto, la razón de ser de este patrón es desacoplar las clases de los objetos, aumentando la modularidad del lenguaje y evitando bucles de actualización. La idea básica del patrón es que el objeto de datos (o sujeto) contenga atributos mediante los cuales cualquier objeto observador (o vista) se pueda suscribir a él pasándole una referencia a sí mismo. De este modo, el sujeto mantiene así una lista de las referencias a sus observadores.

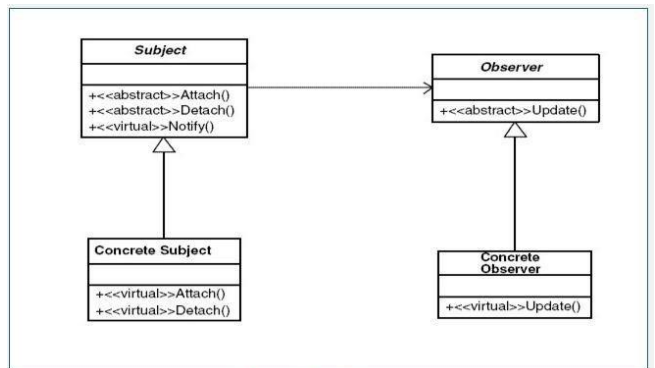


Fig. 3. Esquema del patrón Observer

- **Strategy:** este es un patrón de diseño de software de comportamiento que determina la forma de implementar el intercambio de mensajes entre diferentes objetos que realizan diferentes tareas, pero que comparten elementos comunes. El patrón de comportamiento Strategy permite gestionar un conjunto de operaciones de entre los cuales el cliente puede elegir el que le convenga más en cada situación, e intercambiarlo, de forma

dinámica, cuando lo necesite.

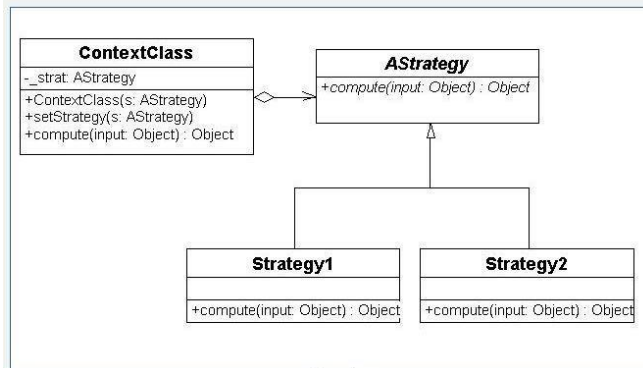


Fig. 4. Esquema del patrón Strategy

5. PATRONES ESTRUCTURALES

Los patrones de diseño estructurales están enfocados en la gestión de la forma en la que las clases y los objetos se combinan para dar lugar a estructuras más complejas. Podemos hablar de patrones estructurales asociados a clases (Adapter) y asociados a objetos (Bridge, Composite, Decorator). Los primeros utilizan la herencia mientras que los segundos se basan en la composición. Los patrones estructurales asociados a objetos describen formas de componer los objetos para conseguir nuevas funcionalidades. La flexibilidad de la composición de estos objetos, surge de la posibilidad de cambiar dicha composición en tiempo de ejecución, lo que es imposible con la composición estática tradicional de clases.

Los patrones estructurales más habituales son:

- **Adapter:** El patrón Adapter convierte la interfaz de una clase en la que otra necesita, permitiendo que clases con interfaces incompatibles trabajen juntas. Por lo tanto, el uso de este patrón estructural está indicado cuando se quiere usar una clase ya implementada y su interfaz no es similar con la necesitada o cuando se desea crear una clase reusable que coopere con clases no relacionadas o que tengan interfaces compatibles.
- **Composite:** El patrón Composite sirve para construir objetos que estén formados por otros objetos más simple, pero siempre similares entre sí, gracias a la composición recursiva. Por lo tanto al tener todos estos objetos una misma interfaz, el Composite simplifica el tratamiento de los mismos. El patrón Composite es ampliamente usado en el tratamiento de interfaces de usuario en la que se necesita, por ejemplo, representar un conjunto de elementos de una interfaz gráfica. Algunos de estos elementos serán simples, mientras que otros serán más complejos y estarán formados por varios elementos simples. Por tanto el comportamiento y/o la información que proporciona un elemento complejo está determinado por los elementos que lo componen.
- **Decorator:** El patrón de diseño estructural Decorador facilita la tarea de añadir dinámicamente funcionalidades a un Objeto. De este modo elimina

la necesidad de crear clases que fuesen heredando de la primera, incorporando no solo una nueva funcionalidad, sino también otras nuevas y asociarlas a ella. A veces se desea adicionar responsabilidades a un objeto pero no a toda la clase. Las responsabilidades se pueden adicionar por medio de los mecanismos de Herencia, pero este mecanismo no es flexible porque la responsabilidad es adicionada estáticamente. La solución flexible es la de rodear el objeto con otro objeto que es el que adiciona la nueva responsabilidad. Este nuevo objeto es el Decorador.

- **Proxy:** este patrón estructural tiene como propósito proporcionar un intermediario para controlar el acceso a un objeto. Por ello tiene distintas aplicaciones:
 - Proxy Remoto: denominado así cuando representa a un objeto remoto.
 - Proxy Virtual: usado para crear objetos bajo demanda.
 - Proxy de Referencia: cuando sirve como sustituto de un puntero que realiza operaciones adicionales cuando accede al objeto.
 - Proxy de Protección: denominado así cuando se usa para controlar el acceso al objeto original.
 La finalidad principal del patrón de diseño estructural Proxy, sería proporcionar un representante o sustituto de otro objeto para controlar el acceso a este.

6. CONCLUSIONES

Aunque en esta sección se debe la conclusión es sencilla, si no usas patrones, deberías hacerlo. Los patrones ayudan a estandarizar el código, haciendo que el diseño sea más comprensible para otros programadores. Son muy buenas herramientas, y como programadores, siempre deberíamos usar las mejores herramientas que están a nuestro alcance.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al profesor Norberto Diaz-Dia por hacerme entender que son muy importantes los patrones de diseño y hay que usarlos cuando desarrollamos una aplicación.

REFERENCIAS

- [1] Web. Introducción a los patrones de diseño ["https://parasitovirtual.wordpress.com/2011/04/02/introduccion-a-los-patrones-de-diseno/"](https://parasitovirtual.wordpress.com/2011/04/02/introduccion-a-los-patrones-de-diseno/) (Enlace web).
- [2] Juan Pavon Mestras, "Patrones de diseño orientado a objeto".
- [3] Carlos Blanco, "Patrones de diseño".
- [4] Erick Gamma, Richard Helm, Ralph Johnson y John Vlissides "Elementos de software orientado a objetos reusable".
- [5] Francisco Javier Martínez Juan, "Guía de Construcción de software en java con patrones de diseño", pp. 106-550.
- [6] Carlos A. Guerrero, Johanna M. Suarez y Luis E. Gutierrez, "Patrones de diseño GOF", Vol. 24(3), 103-114 (2013).

- [7] Eduardo Mosqueira Rey, "Patrones de diseño creacionales".
- [8] Cunningham, W., Beck, K., "Using pattern languages for object-oriented programs".OOPSLA'87, Orlando,1987.
- [9] Zulema Beatriz Rosanigo, "Modelo y Patrones",pp. 30-111.
- [10] Jose Luis Isla Montes, Francisco Luis Gutierrez Vela y Patricia Paderewski Rodriguez, "Una aproximación basada en patrones para el modelado conceptual de sistemas cooperativos",pp.1-7.
- [11] IEEE Latin america transactions, Vol. 5, NO. 4 JULY 2007.
- [12] Craig Larman, "Applyng UML and Patterns" Vol. 3.
- [13] Craig Larman "UML y Patrones" Vol. 2.