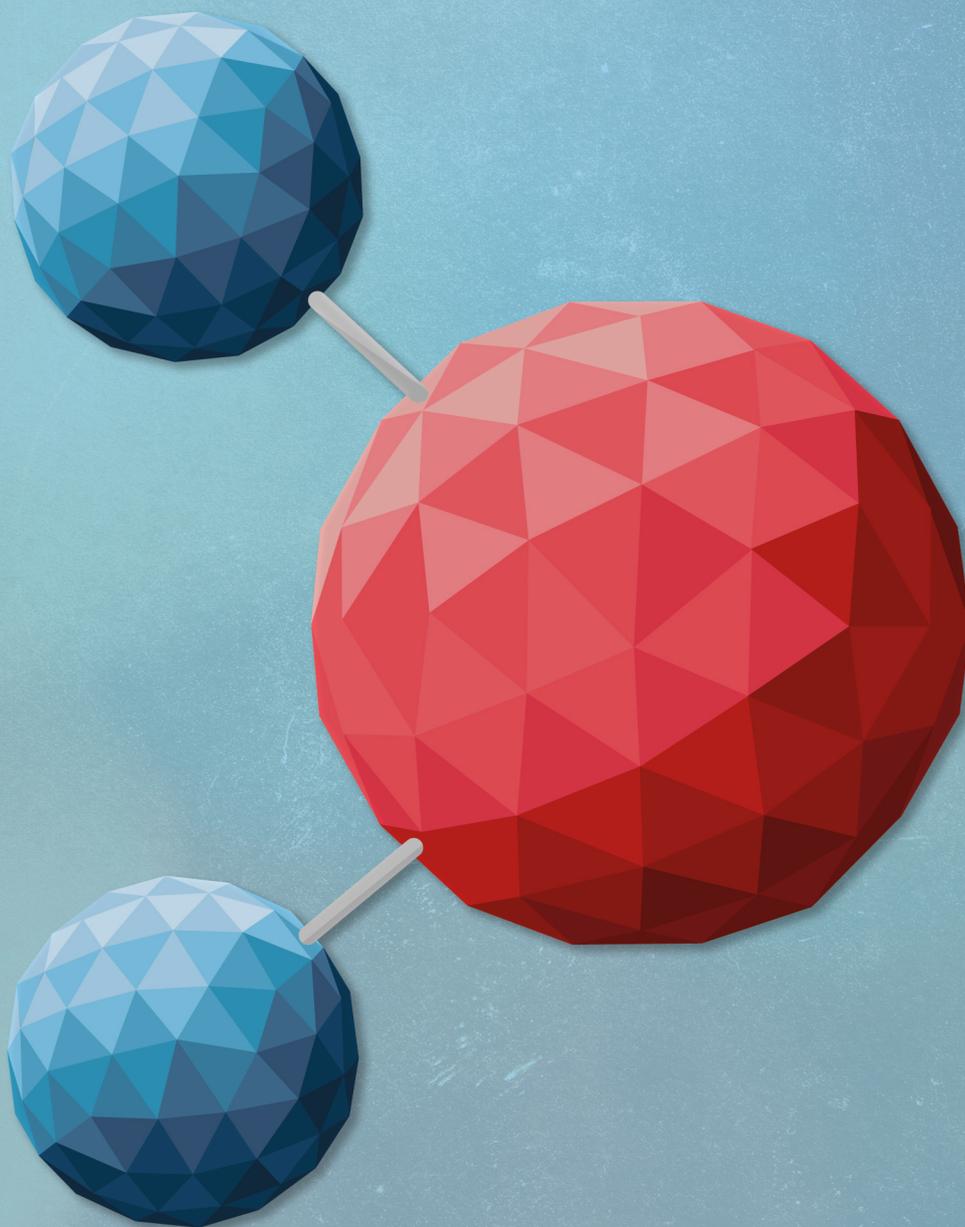


MOLEQLA

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

·Número 26·



Portada

Carmen Santisteban Trigo y María Manuela Valverde

Logotipo y Título de la revista

Juan Manuel García Arcos, Rafael Hoyos Manchado y Rafael Iigo
Roció Escudero Ávila, Inés Maldonado Lasunción y Javier Revello Sánchez

Plantilla de la revista

Norberto Díaz Díaz

Editores de las secciones que aparecen en este número

MoleQla Instituto: Norberto Díaz Díaz
MoleQla Deporte: Alberto Grao Cruces
MoleQla Ambiental: Ana Martín Calvo
MoleQla Energía: Juan José Gutiérrez Sevillano
MoleQla Patrimonio: Pilar Ortiz
MoleQla Instituto: María de los Reyes de la Vega Sánchez
MoleQla Nanotecnología: Ana Paula Zaderenko Partida
MoleQla Celular: Guillermo López Lluch
MoleQla Farmacia: Matilde Revuelta González
MoleQla Médica: Ignacio Jáuregui Lobera

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. Merkling



ISSN 2173-0903

Editado el 21 de Julio de 2017

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

Los vaivenes de temperatura que nos ha traído el inicio del verano del 2017 (con una espectacular ola de calor en junio) nos recuerdan una vez más la amenaza del cambio climático, que ya parece imparable. Los esfuerzos de algunos países por paliar sus efectos chocan con el afán involucionista de los Estados Unidos y su nueva administración, ordenando la retirada de la gran nación americana del Acuerdo de París. Todos estos hechos nos recuerdan la importancia de no sólo llevar y fomentar un estilo de vida más respetuoso con el medio ambiente, si no de apoyar y fomentar los estudios científico-tecnológicos orientados al desarrollo de materiales y procesos “verdes”, esto es, capaces de mantener una sociedad próspera sin modificar de forma radical el entorno y el clima. Esta es la mejor forma de contrarrestar los mensajes de que la lucha contra el cambio climático genera pobreza, cuando es justo al contrario.

A este respecto el número de verano de MoleQla trae un interesante artículo sobre el empleo de bioreactores para la producción de biocombustibles. Los biocombustibles constituyen una excelente tecnología de transición entre el empleo de los combustibles fósiles tradicionales para la producción de energía y otras tecnologías limpias como la energía solar fotovoltaica. También relacionado con ello este número incluye también un trabajo sobre descontaminación de aguas por fotocatalisis, que se añaden a los ya publicados sobre temas relacionados en números anteriores. La nanotecnología y sus aplicaciones médicas han sido tradicionalmente también uno de los temas con mayor protagonismo en MoleQla. Este número trae jugosos artículos sobre el empleo de nanomateriales para tratar la malaria, la diabetes e, incluso, la caries dental. Como no sólo de biotecnología y nanotecnología vive un lector de MoleQla, éste encontrará también otros interesantes artículos para amenizar su verano, dedicados al análisis de obras de arte, la relación entre el modelo estético corporal y la salud, y el desarrollo de videojuegos, entre muchos otros.

Deseando una provechosa lectura, el equipo editorial de MoleQla y todos los que la hacen posible estación tras estación os desean unas agradables y no demasiado calurosas vacaciones de verano.



Juan Antonio Anta

Editor de la Revista MoleQla

ÍNDICE

1. Moleq̃a Ambiental

- 1.1. Fotocatálisis como mejora de la descontaminación de aguas por Microorganismos

2. Moleq̃a Celular

- 2.1. Toda una vida de descubrimientos autofágicos.
- 2.2. El sistema inmunitario en la reproducción
- 2.3. Vacunas de ARN: La más prometedora generación de vacunas

3. Moleq̃a Deporte

- 3.1. La pliometría como entrenamiento de las variables condicionales del rendimiento en futbolistas adolescentes

4. Moleq̃a Energía

- 4.1. Uso de fotobiorreactores para la generación de biocombustibles

5. Moleq̃a Farmacia

- 5.1. Optofarmacología: fármacos fotoinducibles
- 5.2. Taltz (Ixekizumab): nuevo fármaco frente la psoriasis

6. Moleq̃a Informática

- 6.1. Metodologías de desarrollo en videojuegos
- 6.2. The Development Process of a Video game

7. Moleq̃a Instituto

- 7.1. Determinación del grado de acidez de vinagres comerciales de distinta materia prima

8. Moleq̃a Médica

- 8.1. Uso Terapéutico De Los Anticuerpos Monoclonales: Gran Avance En La Práctica Clínica

9. Moleq̃a Nanotecnología

- 9.1. Uso de nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes
- 9.2. Aplicaciones nanotecnológicas en la lucha contra la malaria
- 9.3. Nano-odontología: tratamiento de la caries dental

10. Moleqia Patrimonio

- 10.1. Técnicas analíticas de alta resolución en la identificación y estudio de la degradación de los amarillos de cadmio y cromo en obras de las Primeras Vanguardias (1900-1940)
- 10.2. La Fluorescencia visible inducida por radiación ultravioleta, técnica y aplicaciones en la Fotografía Histórica
- 10.3. Técnicas analíticas aplicadas a la caracterización de la fayenza egipcia

Fotocatálisis como mejora de la descontaminación de aguas por microorganismos

Adán Martín Rubio

Resumen— La falta de disponibilidad y de recursos para obtener agua potable ha impulsado el desarrollo de ingeniosas tecnologías como SODIS, basada en la purificación de aguas por eliminación de microorganismos a través de la luz solar. Esta técnica fotoquímica puede mejorarse a través de la fotocatalisis, utilizando un catalizador semiconductor de TiO_2 con múltiples aplicaciones contra la contaminación ambiental; en nuestro caso, el tratamiento de aguas naturales para uso cotidiano.

Palabras Claves— Fotocatálisis, Dióxido de titanio, Potabilización, SODIS, Luz solar.

1. INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los elementos naturales más esenciales de la vida humana. A pesar de que el acceso al agua potable se ha mejorado globalmente en estos últimos años [1], son aún muchos los países los que presentan graves problemas de escasez de recursos hídricos para su subsistencia y su desarrollo socioeconómico.

Entre los contaminantes frecuentes a eliminar en la potabilización del agua, podemos encontrar tanto microorganismos, como compuestos inorgánicos u orgánicos.

Como podemos imaginar, los procesos de saneamiento de aguas presentan unos costes no asumibles por muchas poblaciones. Por ello, han ido apareciendo métodos de desinfección de aguas más asequibles, como puede ser SODIS. Este eficaz sistema tan solo utiliza la luz solar para el tratamiento de las aguas, que podría mejorarse a través de la aplicación de la fotocatalisis.

El uso de la luz solar por parte de un catalizador es una de las principales aplicaciones de la Química Verde, que cumple con los objetivos de los siguientes mandamientos:

- Economía atómica, ya que el uso de catalizadores minimiza la cantidad de reactivos necesarios y de productos de desecho del proceso.
- Eficiencia energética, ya que la utilización de catalizadores reduce la energía de activación de la reacción, por lo que dichos procesos pueden realizarse a temperatura y presión ambiente, con el consiguiente ahorro energético.
- Catalizadores mejor que reactivos; en el nuestro caso: TiO_2 , un catalizador heterogéneo.
- Prevención de accidentes, ya que se debe elegir un adecuado material plástico que contenga las aguas a purificar, sin dejar residuos en el mismo.

2. FOTOCATÁLISIS

2.1. Mecanismo

La fotocatalisis consiste en una reacción catalítica, mediada por la irradiación de luz, en la que el catalizador atenúa la energía de activación necesaria, y con ello, acelera la reacción fotoquímica.

Cuando la energía solar incidente, en forma de fotón, impacta de manera igual o mayor a la energía del salto de banda (o “band gap”) de la superficie del catalizador semiconductor, provoca el salto de los electrones de la capa de valencia hacia la capa de conducción (Fig.1). Esto genera un par electrón-hueco (e^- y h^+), que puede ser aprovechado para catalizar las reacciones redox en la interfaz partícula-solución [2]. De hecho, son las especies reactivas del oxígeno producidas las que actúan como fuertes agentes oxidantes en la destucción de múltiples contaminantes químicos o la muerte de microorganismos en aguas.

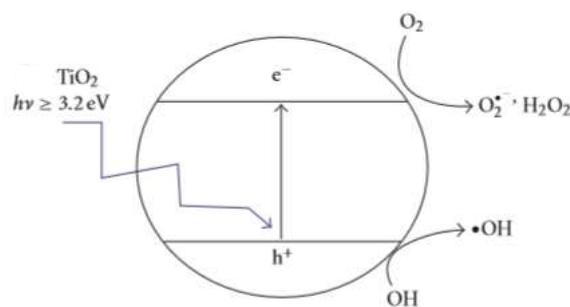


Fig.1. Diagrama del mecanismo de fotocatalisis en partículas de TiO_2 [2].

2.2. Catalizador semiconductor

Existen una gran variedad de catalizadores semiconductores de utilidad en la fotocatalisis, como pueden ser los óxidos de metal (de titanio, zinc, hierro, circonio, vanadio o estaño) o los sulfuros de metal (de cadmio o zinc).

Sin embargo desde su descubrimiento [4], el dióxido de titanio (TiO_2) se consolida como el mejor fotocatalizador para las aplicaciones ambientales [5], con ventajas sobre el coste económico, la capacidad química, la estabilidad fisicoquímica y la falta de toxicidad. Este semiconductor requiere de radiación ultravioleta, ya que presenta una energía de salto de banda de 3.2 eV (Fig.1)

3. SODIS

SODIS (o "Solar Disinfection of Water") [6] es un sistema sencillo y económico para descontaminar agua de uso doméstico, aplicado en multitud de países en vías de desarrollo. Se basa en el almacenamiento de aguas a tratar en botellas transparentes, preferiblemente de material PET, que permitan la entrada de radiación solar dentro del mismo.

Tras un tiempo determinado de exposición, la radiación solar produce la inactivación de los patógenos mediante fotólisis, transformando el agua en segura para consumir. En concreto, se ha demostrado en laboratorios que el mecanismo biocida de SODIS depende principalmente de la radiación UV-A que induce daños directos sobre la membrana celular y retarda el crecimiento bacteriano [7], así como afecta indirectamente mediante las especies reactivas del oxígeno producidas a través del oxígeno disuelto en el agua [8].

Estudios anteriores sugieren que los procesos de desinfección fotocatalítica destacan principalmente por la acción de los radicales hidroxilos como responsable de la inactivación de microorganismos, seguidos de otros agentes como los peróxidos de hidrógeno o los superóxidos [2]. Dicha especie reactiva del oxígeno causa la disrupción de la membrana celular de los microorganismos, mediante la peroxidación de sus fosfolípidos insaturados, que conduce a la pérdida de las funciones respiratorias contenidas en ellas [9], y a la pérdida de su fluidez, por una mayor permeabilidad iónica [10]. Asimismo, se puede llegar a pensar que este daño a la membrana da paso a un ataque oxidativo más profundo sobre los elementos internos celulares.

También es dependiente de la radiación infrarroja, cuya inactivación térmica se muestra significativa a temperaturas superiores de 40-45° [11].

4. DESCONTAMINACIÓN DE AGUAS POR FOTOCATÁLISIS

Uno de los trabajos más importantes en materia de desinfección de aguas mediante fotocatalisis por contaminación de microorganismo, está referido a la inactivación de *Escherichia coli*, a través de films de nanopartículas inmovilizadas de TiO_2 [3]. Como fue de esperar, la tasa de inactivación de *E. coli* era más elevada mediante UV-A en

presencia del catalizador semiconductor, tanto para agua destilada como para agua superficial, frente a la tasa de inactivación fotolítica (Fig. 2).

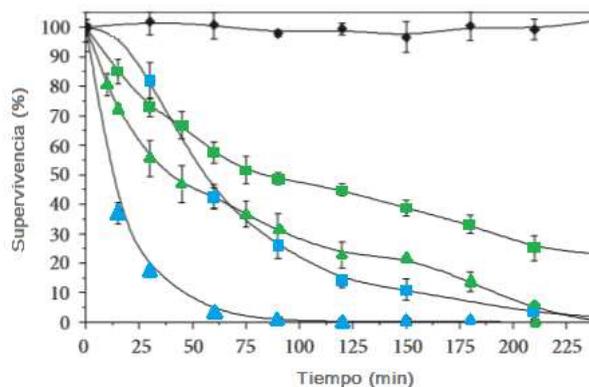


Fig.2. Comparación entre las tasas de inactivación fotocatalítica y fotolítica de *E. coli* [3].
△ (TiO_2 , UV, Agua destilada), □ (TiO_2 , UV, Agua superficial), △ (UV, Agua destilada), □ (UV, Agua superficial), ● Control.

Finalmente, cabe destacar también que el contenido en materia orgánica e inorgánica de las aguas superficiales reduce la tasa de inactivación bacteriana en ambos casos, frente a la del agua destilada. Se descubrió que el principal responsable de la reducción de la tasa de inactivación es la materia orgánica, ya que compite por las especies reactivas del oxígeno y por la absorción de fotones. Seguido a ella, se encuentran los iones inorgánicos (sulfatos y nitratos), que además compiten por la adsorción a la superficie del catalizador. Mediante un tratamiento previo de las aguas a tratar por fotocatalisis, como filtración o sedimentación, sería fundamental para recuperar la eficiencia de la tasa de inactivación de los microorganismos.

Por tanto, está demostrado que la fotocatalisis bajo radiación UV-A es más efectiva que la fotólisis sin catalizador para remediar aguas contaminadas por microorganismos. Sin embargo, estos estudios fueron realizados en reactores con lámparas UV, a escala de laboratorio. Para comprobar la eficacia real de la fotocatalisis en el sistema SODIS es necesario llevar a cabo estudios a escala piloto con luz y aguas naturales. De esta manera, se analizó aguas de manantial contaminadas con bacterias coliformes, como *E. coli*, en tubos de vidrio [12]. Estos envases se expusieron a la luz solar directa, y con adición o no del catalizador semiconductor TiO_2 . Se encontró que SODIS mejoraba notablemente su eficiencia con los procesos fotocatalíticos en la inactivación de las bacterias coliformes totales (Fig.3.1) y coliformes fecales (Fig.3.2). Por último, se observó también que el rebrote bacteriano solo tuvo lugar en SODIS sin TiO_2 , por lo que se expone que la fotocatalisis es capaz de impedir la recuperación de las bacterias al estrés sometido en el proceso de desinfección.

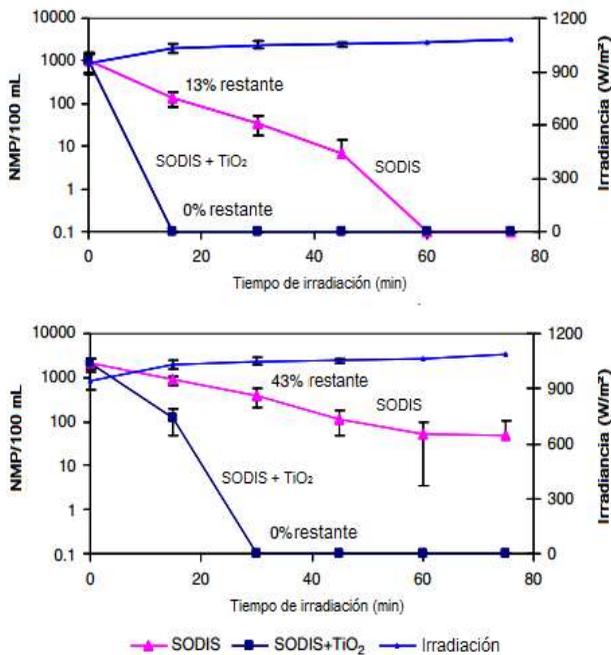


Fig.3. Comparación entre las tasas de decrecimiento bacteriano coliforme total y fecal mediante tratamiento con SODIS, en presencia y ausencia de TiO₂ (Radiación media 1037 W/m²) [12].

5. CONCLUSIONES

No podemos negar la eficiencia de SODIS para la accesibilidad de agua potable y segura, como recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) en aquellas poblaciones en vías de desarrollo sin más recursos alguno.

Sin embargo, el tratamiento de aguas mediante SODIS puede incrementar considerablemente su eficacia de desinfección, mediante un económico catalizador (TiO₂) que garantiza la seguridad de las aguas de consumo, ampliamente demostrado tanto a escalas de laboratorio como a escalas reales piloto.

La fotocatalisis en el sistema SODIS puede llevar a futuras mejoras en el proceso, encaminadas a estudios de la adición de compuestos fuertemente oxidantes (como H₂O₂ u O₃) que aceleren la inactivación de microorganismos o estudios sobre el diseño de los fotorreactores, entre otros.

REFERENCIAS

[1] World Health Organization (WHO), "Drinking-water," *Media centre*, 2016. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en/>.

[2] J. A. Byrne, P. A. Fernandez-Ibañez, P. S. M. Dunlop, D. M. A. Alrousan, and J. W. J. Hamilton, "Photocatalytic enhancement for solar disinfection of water: A review," *Int. J. Photoenergy*, vol. 2011, 2011.

[3] D. M. A. Alrousan, P. S. M. Dunlop, T. A. McMurray, and J. A. Byrne, "Photocatalytic inactivation of E. coli in surface water using immobilised nanoparticle TiO₂ films," *Water Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 47-54, 2009.

[4] A. Fujishima and K. Honda, "Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode," *Nature*, vol. 238, no. 5358, pp. 37-38, 1972.

[5] M. Kaneko and I. Okura, *Photocatalysis: Science and Technology*, Biological. Springer, 1972.

[6] Programa de Agua y Saneamiento (PAS), "SODIS. Desinfección Solar del Agua.," 2003. [Online]. Available: http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente_material/manual_s.pdf.

[7] A. Hamamoto *et al.*, "New water disinfection system using UVA light-emitting diodes," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 103, no. 6, pp. 2291-2298, 2007.

[8] R. Khaengraeng and R. H. Reed, "Oxygen and photoinactivation of Escherichia coli in UVA and sunlight," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 99, no. 1, pp. 39-50, 2005.

[9] A. G. Rincón and C. Pulgarin, "Field solar E. coli inactivation in the absence and presence of TiO₂: Is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection?," *Sol. Energy*, vol. 77, no. 5, pp. 635-648, 2004.

[10] K. Sunada, T. Watanabe, and K. Hashimoto, "Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 156, no. 1-3, pp. 227-233, 2003.

[11] K. G. McGuigan, T. M. Joyce, R. M. Conroy, J. B. Gillespie, and M. Elmore-Meegan, "Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: Characterizing the bacterial inactivation process," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 84, no. 6, pp. 1138-1148, 1998.

[12] S. Gelover, L. A. Gómez, K. Reyes, and M. Teresa Leal, "A practical demonstration of water disinfection using TiO₂ films and sunlight," *Water Res.*, vol. 40, no. 17, pp. 3274-3280, 2006.



Adán Martín Rubio. Graduado en Ciencias Ambientales (2012-2016), por la Universidad Pablo de Olavide. Actualmente, terminado de cursar el primer año del Máster Universitario de Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria.

Toda una vida de descubrimientos autofágicos.

Andrés González Dacosta, Andrés Prieto Rodríguez

Resumen— El desarrollo de la biología molecular y las técnicas de microscopía electrónica han permitido caracterizar miles de procesos intracelulares que hace tan sólo 5 décadas se pensaban imposibles. En 2016, Yoshinori Ohsumi, culmina el Premio Nobel en Fisiología o Medicina con el mecanismo de autofagia, identificando genes involucrados en esta ruta degradativa y cuyo sentido biológico sigue ampliándose hoy día.

Palabras Claves— Autofagosoma, flujo autofágico, genes ATG, quinasa TOR, ATG8.



1. INTRODUCCIÓN

El biólogo celular japonés Yoshinori Ohsumi ha sido otorgado el Premio Nobel de Medicina 2016 por su descubrimiento de la autofagia al ser clave sus estudios en levaduras para entender cómo las células recogen y descomponen las proteínas intracelulares y orgánulos en un proceso crítico para la supervivencia celular.

El concepto de autofagia se observó por primera vez en la década de los sesenta. No obstante, no fue hasta principios de los años noventa cuando Yoshinori Ohsumi realizó una serie de experimentos con levaduras de panadería que lo llevaron a identificar los genes y las proteínas que regulan las distintas etapas de la formación del autofagosoma como pequeña vesícula que contiene material a degradar en la vacuola.

La autofagia se considera un mecanismo de autodefensa que evita la acumulación de residuos o material tóxico en las células. En este sentido, la autofagia actúa como tampón en el estrés metabólico, ayuda a eliminar bacterias y virus tras la infección, promueve el desarrollo embrionario y la diferenciación celular y compensa los efectos negativos del envejecimiento.

Este descubrimiento ha sido crítico para entender cómo la autofagia juega un papel en la resistencia a la terapia del cáncer. Igualmente investigaciones recientes han mostrado que algunas células cancerosas en regiones hipóxicas usan la autofagia para sobrevivir al estrés metabólico, lo cual indica que el proceso puede ser objetivo de fármacos en terapias contra el cáncer [1].

2. EL ENIGMA DE LA AUTOFAGIA

Desde mitad del siglo XX, se comenzaba a postular que enzimas proteolíticas eran secuestradas dentro de una estructura membranosa, antes desconocida, que Christian de Duve [2] (Premio Nobel en Fisiología o Medicina, 1974, junto a Albert Claude y George E. Palade) denominó lisosoma [3]. Este distintivo orgánulo fue caracterizado a través de microscopía electrónica comparativa como el centro principal de degradación de los constituyentes

celulares citoplasmáticos, tales como proteínas, carbohidratos y lípidos. Posteriormente, se observó incluso que orgánulos completos podrían alojarse en estas cavidades membranosas. Asimismo, se vio cómo las estructuras celulares crecían a la vez que la degradación progresaba.

Fue entonces cuando, tras ver la capacidad de digestión parcial del contenido citoplasmático, de Cuve acuñó el término de autofagia en 1963 [4].

Con los años, se observó que este fenómeno de destrucción incrementaba durante la diferenciación embrionaria, remodelación y renovación en una gran variedad de tejidos (como el cerebro, intestino, hígado, pulmones, piel, etc.) y en condiciones de estrés metabólico en respuesta a la inanición celular.

Durante las décadas siguientes, los avances en este campo dieron evidencias de que en el estado temprano de la autofagia incluía la formación de una estructura con doble membrana, llamada fagóforo, y que englobaba a una porción del citoplasma, aunque carecía de enzimas hidrolíticas. A esto se denominó autofagosoma. El lisosoma proporcionaría las enzimas degradativas al autofagosoma, tras una fusión de orgánulos, que culminaría en la formación del autofagolisosoma [5] y la degradación del material celular.

Se fueron descubriendo los mecanismos moleculares poco a poco, pero la razón, los componentes que promovían este proceso biológico y el papel de este en las patologías humanas siguieron escondidos durante muchos años.

3. EL DESCUBRIMIENTO DEL MECANISMO AUTOFÁGICO

Yoshinori Ohsumi estudió la autofagia en la levadura *S. Cerevisiae* como modelo, comprobando primero que existiera en este microorganismo. Observó que la inhibición de las enzimas de degradación vacuolar suponía una acumulación de compuestos en este orgánulo. Como con-

secuencia, creó cepas de levadura carentes de proteasas vacuolares y descubrió que al cultivarlas en medio sin nutrientes, los cuerpos autofágicos se acumulaban en la vacuola [6].

Lo siguiente que realizó fue inducir mutaciones aleatorias en células de esas levaduras modificadas genéticamente para identificar mutantes incapaces de almacenar cuerpos autofágicos en la vacuola. Así pues, en 1993 Ohsumi había descubierto 15 genes esenciales para la activación de la autofagia, los cuales denominó genes APG 1-15 (véase Figura 1). Sin embargo, al identificarse más genes, se creó una nomenclatura con la abreviatura ATG7. [8]

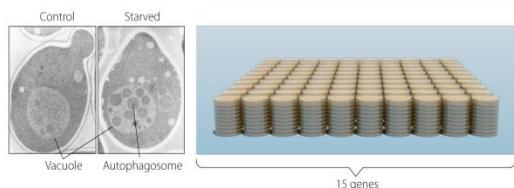


Fig 1. En la izquierda se aprecia la vacuola de una célula de una levadura control, en el centro se ve cómo aparecen los autofagosomas en las vacuolas de las levaduras modificadas y sin nutrientes. Finalmente, en la derecha se observan los 15 genes esenciales para la autofagia que Ohsumi descubrió [9].

Años después, Ohsumi clonó varios genes ATG y caracterizó la función de los productos proteicos generados. Así, la clonación del gen ATG1 reveló que éste codifica una quinasa de serina-treonina, lo cual pone de manifiesto el papel de la fosforilación proteica en la autofagia. Además, se pudo concretar que el gen ATG1 interacciona con el producto del gen ATG13 para formar un complejo cuya formación está regulada por la quinasa "target of rapamycin" (TOR) [11] [12].

TOR se encuentra activa en células cultivadas en condiciones ricas de nutrientes y genes ATG13 hiperfosforilados para impedir la formación del complejo anteriormente indicado. Por el contrario, en medio sin nutrientes, TOR se desactiva haciendo que el gen ATG13 desfosforilado se una a ATG1. La formación de este complejo es un primer paso esencial para la cascada de eventos que culminan en la formación del autofagosoma [12].

La formación del autofagosoma implica la proteína de membrana integral ATG8 y un complejo de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K). Asimismo, otras proteínas ATG se incorporan a la membrana del fagóforo que formará el autofagosoma maduro mediante dos cascadas de conjugación de proteínas de tipo ubiquitina (véase Figura 2).

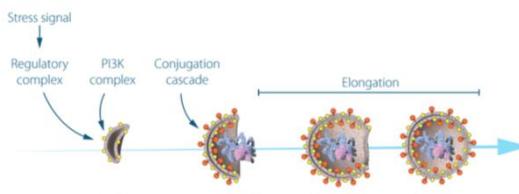


Figura 2. Esquema de cómo las señales de estrés pueden iniciar la autofagia y la formación de los autofagosomas [9].

Los estudios realizados sobre la localización de ATG8 mostraron que en "células hambrientas", ATG8 formó grandes agregados que co-localizaron con autofagosomas y cuerpos autofágicos [13]. Así, la localización en la membrana de ATG8 que se une covalentemente a la fosfatidiletanolamina lipídica de la membrana depende de estos dos sistemas que comparten la misma enzima activadora (ATG7) y que actúan uno tras otro.

En el primer evento, ATG12 se une a una proteína ATG5 formando un complejo que recluta a ATG16 para actuar como ligasa del segundo sistema de conjugación tipo ubiquitina [14][15]. En este segundo evento de conjugación, se activa a ATG8 para su transferencia a la enzima de conjugación ATG3, permitiendo finalmente la conjugación de ATG8 a la fosfatidiletanolamina [16]. Por lo tanto, el ATG8 se considera un factor de gran importancia en la elongación y fusión de los autofagosomas.

4. UN PROCESAMIENTO CELULAR VITAL.

Actualmente, la autofagia está demostrada ser un proceso que tiene lugar constantemente en las células a nivel basal y es el único que destruye orgánulos completos, teniendo un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis y reciclaje celular. En paralelo y no más trivial, el flujo autofágico (entendido como la expulsión final del resultado de la degradación autofágica) tiene que estar en equilibrio con la autofagia.

Cualquier desorden genético o molecular que conlleve una desregulación de cualquiera de estos procesos se relaciona con enfermedades neurodegenerativas, cáncer e infecciones por virus y bacterias.

5. CONCLUSIONES

Gracias a Ohsumi y su descubrimiento de los genes autofágicos ha sido posible identificar homólogos de mamíferos de los genes de levadura ATG que permitan estudios de la función autofágica en eucariotas superiores, convirtiéndose ésta en una de las áreas más estudiadas de la investigación en biomedicina y con futuras aplicaciones en dianas farmacológicas en terapia contra el cáncer.

REFERENCIAS

- [1] Cancer Discov. 2016 Dec. 6(12):1298-1299
- [2] "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1974". Nobelprize.org. Web. 25 Jan 2017.
- [3] de Duve, C. 2005. Nat Cell Biol 7 (9), 847-849.
- [4] de Duve, C et al. 1966. Rev Physiol 28, 435-492.
- [5] Arstila, A.U et al. 1968. Am J Pathol 53, 687-733.
- [6] Takeshige et al. 1992. J Cell Biol 119, 301-311.
- [7] Tsukada et al. 1993. FEBS Lett 333, 169-174.
- [8] Klionsky et al. 2003. Dev Cell 5, 539-545.
- [9] Web nobelprize.org.
- [10] Matsuura et al. 1997. Gene 192, 245- 250.
- [11] Funakoshi et al. 1997. Gene. 192, 207- 213.
- [12] Kamada et al. 2000. J Cell Biol 150, 1507-1513.
- [13] Kirisako et al. 1999. J Cell Biol 147, 435-446.
- [14] Ohsumi, Y. 2014. Cell Res 24, 9-23.
- [15] Mizushima et al. 1999. EMBO J 18, 3888-3896.
- [16] Ichimura et al. 2000. Nature 408, 488-492.



Andrés González Dacosta estudiante de 4º del Grado en Biotecnología de la Universidad Pablo de Olavide (promoción 2013-2017).



Andrés Prieto Rodríguez estudiante de 4º del Grado en Biotecnología de la Universidad Pablo de Olavide (promoción 2013-2017).

El sistema inmunitario en la reproducción

Christian Carrizosa Balmont

Resumen— El sistema inmunitario juega un importante papel en la reproducción, desde la misma inseminación hasta el parto. El carácter semialogénico del feto con respecto a la madre requiere de mecanismos inmunomoduladores que aseguren el correcto desarrollo del embarazo y equilibren tolerancia al feto y función defensiva, especialmente en la interfase materno-fetal. El conocimiento de dichos mecanismos abre la puerta al desarrollo de herramientas tolerogénicas aplicables a transplantes.

Palabras Claves— Semialogénico, Tolerancia inmunológica, Células Treg, Interfase materno-fetal, HLA-G.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario es el responsable de defendernos de las amenazas, tanto internas como externas, a las que día a día nos enfrentamos, y cuya naturaleza es enormemente variable: desde un pequeño microorganismo hasta una partícula contaminante, pasando por nuestras propias células, que pueden adquirir características que las conviertan en “extrañas” bajo determinadas circunstancias (por ejemplo, infección vírica, cáncer...).

Precisamente en este mecanismo se fundamenta el rechazo que se puede dar en los transplantes: el sistema inmunitario de cada persona reconoce sus propios *antígenos*, pero no los de otra persona diferente (salvo casos excepcionales, como gemelos univitelinos). Esta acción protectora/agresiva entra en conflicto en el embarazo, en el cual la madre ha de *tolerar* los antígenos de un feto *semialogénico* (Fig. 1), es decir, que comparte algunos, pero no todos los genes.

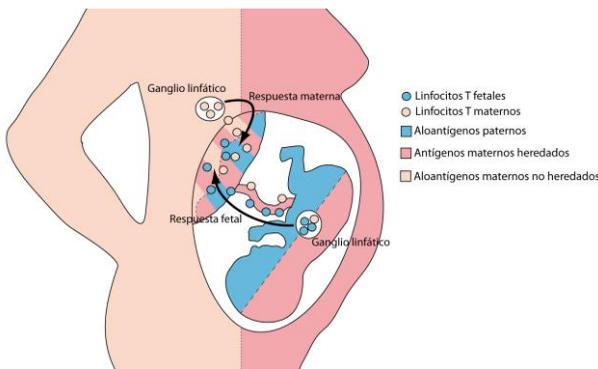


Fig. 1. El feto es considerado un trasplante semialogénico. [1]

La preservación de la función protectora a la vez que se permite el desarrollo fetal dependerá de una fina regulación del sistema inmunitario gracias a la comunicación molecular materno-fetal durante el embarazo, y que es algo más complicado que la hipótesis inicial de no-reconocimiento sugería. Además de explicar algunos de estos mecanismos, en el artículo se presentarán también los efectos que el sistema inmune desempeña en los procesos de inseminación y parto, y que también pueden influir en la consecución de un exitoso embarazo.

2. CITOQUINAS E INSEMINACIÓN

Aunque el fin principal de la inseminación sería la “entrega” de espermatozoides, lo cierto es que hay evidencias de que otros componentes en el semen podrían jugar un papel clave, que no esencial, en los procesos de desarrollo e implantación; de hecho, la adición de plasma seminal o algunos de sus factores a las técnicas de reproducción asistida incrementa la tasa de éxito en algunos animales, incluyendo humanos. Entre estos factores destacan una serie de citoquinas como IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN γ , TNF α , y TGF β ; este último, presente a una concentración mucho mayor que la encontrada en el plasma sanguíneo, se ha demostrado interacciona con células epiteliales del útero para inducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (GM-CSF, CSF-1, IL-1 α , IL-6, LIF, RANTES y MIP-1 α), produciendo una respuesta inflamatoria que afecta a los procesos de desarrollo pre-implantación, implantación e invasión del trofoblasto. Así, estas citoquinas atraen al endometrio (Fig.2): [2], [3]

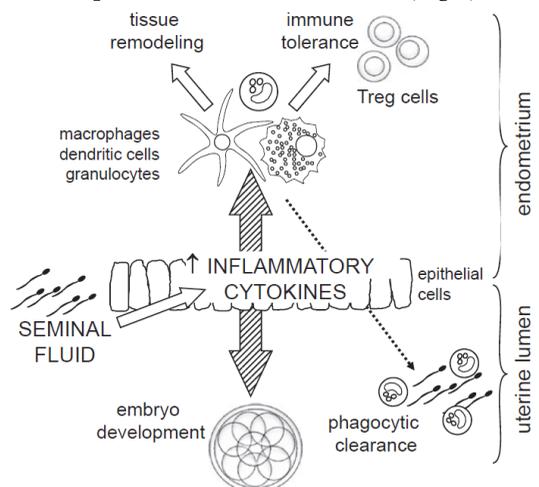


Fig. 2. Efectos del fluido seminal en útero y endometrio. [3]

- Macrófagos y células dendríticas que modifican la receptividad endometrial y activan a células T reguladoras (Treg) para inducir tolerancia. [3]
- Neutrófilos que eliminan vía fagocitosis los restos celulares del fluido seminal. [3]

Un detalle de interés es que, aunque no está del todo claro si los espermatozoides expresan en su superficie complejos de histocompatibilidad, el eyaculado contiene células epiteliales y leucocitos que sí los expresan, lo cual podría provocar su reconocimiento como “extraño” y consiguiente rechazo. Lo cierto es que el microambiente de citoquinas generado puede jugar un papel esencial en la inducción de tolerancia. Además, otro compuesto de interés en el fluido seminal es la prostaglandina E2, de función pro-inflamatoria e inmunosupresora, y que promueve respuestas mediadas por Th2 e inhibe Th1, lo cual también contribuiría a la tolerancia. [2], [4]

3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOLERANCIA

En la implantación, las células del trofoblasto extraveloso invaden la decidua (nombre que recibe el endometrio durante la gestación), destruyendo paredes de arterias espirales para asegurar un adecuado riego sanguíneo. Aunque las células del trofoblasto veloso no expresan MHC de tipo I, las del extraveloso sí que lo hacen, concretamente un tipo clásico (HLA-C), y dos no clásicos (HLA-G y HLA-E). Desde un principio la investigación se ha centrado en HLA-G, al estar su expresión constitutiva restringida a estas células. Más adelante se discutirán los mecanismos por los que HLA-G es considerado tolerogénico y sus posibles aplicaciones en el futuro. [5], [6]

La placenta, formada a las 5 semanas tras la implantación por trofoblasto y decidua, supone una interfase que conecta feto y madre, permitiendo el intercambio de nutrientes y gases. Se producen una serie de cambios espaciotemporales en la expresión de moléculas co-señalizadoras (B7-H1, B7-H1, ICOS-L, B7-H3, B7-H4, etc.) que permitirán la continua adaptación del sistema inmune materno al desarrollo del feto durante el embarazo; de hecho, su desregulación es frecuente en casos de aborto recurrente (Fig. 3), y en estos se observa una anormalmente alta expresión de moléculas co-activadoras, y una anormalmente baja de co-inhibidoras. [7]

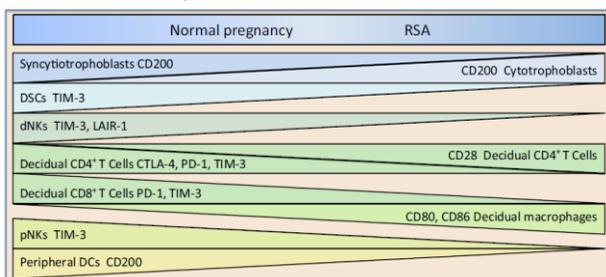


Fig. 3. Expresión diferencial de moléculas co-señalizadoras en embarazos normales frente a aborto recurrente (RSA). [7]

La clave está en la generación de un ambiente tolerogénico que permita la diferenciación de los linfocitos T a Treg, que serán los que supriman la respuesta inmune de la madre hacia el feto, y viceversa. Así, cuando estos linfocitos reconozcan al aloantígeno, inducirán en su microambiente, la placenta, la apoptosis de otras células inmune efectoras y secretarán un patrón de citoquinas inhibitorias de la respuesta inmunitaria, como IL-10 y TGFβ, que a su vez favorecen la diferenciación a Treg. [1]

4. LAS CÉLULAS EN LA INTERFASE MATERNO-FETAL

En la decidua encontramos fundamentalmente tres tipos celulares del sistema inmune: células *natural killer* (NK), linfocitos T y macrófagos.

4.1. Células NK

Son las más numerosas (60-80%) durante los tres primeros meses, tras lo cual sus números disminuyen de forma significativa. Presentan un fenotipo que hace que se favorezca su actividad secretora de citoquinas, quimioquinas y factores angiogénicos, en lugar de la citotóxica. [7]

Además, son capaces de adquirir HLA-G de las del células del trofoblasto mediante trogocitosis, tras lo cual la molécula es endocitada para disparar su señalización inhibidora desde dentro de la misma célula NK. Existen ciclos de trogocitosis, endocitosis, degradación y readquisición que permiten la regulación de estas células por parte de las del trofoblasto. Sin embargo, si la NK es activada por citoquinas, o por productos virales, el ciclo es interrumpido para potenciar su actividad citotóxica. De esta forma existe un delicado equilibrio entre tolerancia y citotoxicidad mediada por células NK deciduales. [8]

4.2. Linfocitos T

Constituyen el 15% de las células inmunitarias en la decidua hasta el tercer mes, cuando sus números suben hasta un 70% para estabilizarse el resto del embarazo. En las CD4+ se registra un cambio desde los tipos proinflamatorios Th1 y Th17, hacia el anti-inflamatorio Th2 y regulador Treg. Este cambio sería dependiente de la actividad de las células dendríticas y de los macrófagos. [7]

4.3. Macrófagos

Constituyen el 10-20% de la población de células del sistema inmune en la decidua, y tienen varias funciones. Por un lado, se encargan de coordinar la angiogénesis y remodelación tisular gracias a la fagocitosis de matriz extracelular y secreción de factores de crecimiento, proteasas y quimioquinas; por otro, también controlan la inflamación a través de la secreción de citoquinas anti-inflamatorias y eliminación de cuerpos apoptóticos. Cabe destacar que en las primeras fases de la implantación los macrófagos muestran una actividad pro-inflamatoria, que poco a poco evolucionará a anti-inflamatoria. [7]

4.4. Otras células

La población de linfocitos B es muy reducida (incluso ausente) en la decidua, y en general no se conocen sus funciones en el embarazo. Recientemente, se ha descubierto que podrían estar protegiendo frente a parto prematuro mediante la producción de factor bloqueante inducido por progesterona 1 (PIBF1), cuya expresión es inducida por IL-33. Su desregulación podría llevarlas a diferenciarse a células plasmáticas, cuyos anticuerpos secretados dispararían cascadas de señalización inflamatorias que culminarían en el parto prematuro (Fig. 4). [9]

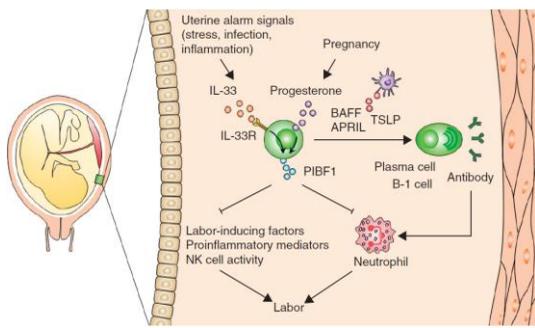


Fig. 4. Los linfocitos B evitarían el parto prematuro. [9]

5. EL SISTEMA INMUNE Y EL PARTO

Se hipotetiza que el siguiente programa de eventos inflamatorios influiría en el parto (Fig. 5). La decidua y el miometrio sintetizan y liberan quimioquinas para provocar la extravasación de células del sistema inmunitario, monocitos fundamentalmente, hacia dichos tejidos, donde provocarían respuestas inflamatorias. Así, en la decidua estas células provocarían la síntesis de prostaglandinas que pueden estimular al miometrio, mientras que en el miometrio se sintetizarían proteínas que aumentarían su contractibilidad, favoreciendo así el parto. [10]

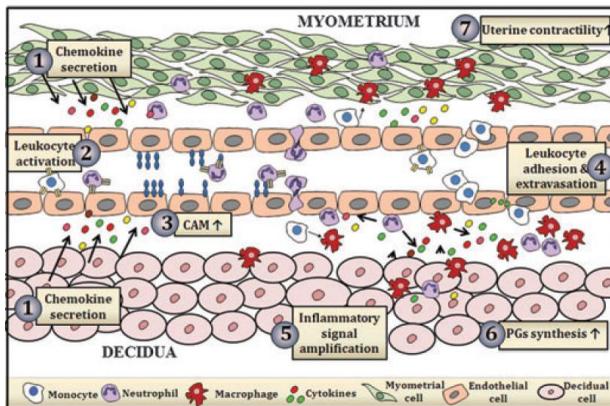


Fig. 5. Hipotético programa de eventos que influyen en el parto. [10]

6. EL EFECTO TOLEROGÉNICO DE HLA-G

Como se adelantó previamente, HLA-G es un tipo no clásico de MHC de tipo I. Presenta una gran diversidad de variantes generadas por *splicing* alternativo (hasta siete), y a la vez un polimorfismo mucho más reducido con respecto a los otros complejos de histocompatibilidad. Está muy relacionado con la tolerancia, tanto a corto como largo plazo, y de hecho se sabe que una alta expresión en los receptores de un alotransplante mejora el pronóstico (en cuanto a no rechazo). De hecho, como los posibles polimorfismos de HLA-G ocurren fuera del surco de presentación, el repertorio de péptidos que éste puede unir es muy limitado, y no es capaz de ser reconocido como antígeno extraño por el receptor de linfocito T. [6]

La tolerancia a corto plazo incluye varios mecanismos: (1) HLA-G actúa como ligando del receptor ILT2 en células T, B y NK, inhibiendo citotoxicidad, producción de

anticuerpos y proliferación; (2) cierta isoforma (HLA-G5) interacciona con CD8 en ciertas poblaciones de células T y NK, conduciendo a su eliminación; (3) indirectamente, la presencia de HLA-G permite la expresión de HLA-E, que ejerce efecto inhibitorio sobre las células T y NK. [6]

La tolerancia a largo plazo depende de la inducción de células T reguladoras (Treg) y supresoras, nuevamente por diferentes mecanismos: (1) HLA-G5 y HLA-G1 pueden unirse a ILT4 en células dendríticas para inhibir su maduración e inducirles anergia, de modo que estas favorezcan la diferenciación de linfocitos T a reguladores; (2) de un modo directo, las células mieloides pueden interactuar con HLA-G y ser inducidas a Treg; (3) células dendríticas que expresen HLA-G1 son capaces de diferenciar células CD4+ y CD8+ a Treg, e inducir la aparición de células T reguladoras aloespecíficas. [6]

6.1. Aplicación en trasplantes

Como se ha indicado, un mejor pronóstico de trasplante correlaciona con los niveles de expresión de HLA-G del receptor, al menos en los casos de corazón, hígado, riñón y pulmón. ¿Sucedería lo mismo si HLA-G fuera administrado de forma exógena en su versión soluble? Los resultados parecen, por el momento, prometedores. En un reciente estudio por von Websky *et al.* [11] se observa un significativo efecto inmunosupresor para un trasplante de intestino delgado, aunque por sí mismo HLA-G no es capaz de evitar el rechazo agudo; se hipotetiza que se requeriría una combinación de inmunosupresores. En el caso de trasplantes más sencillos, como uno de piel, LeMaoult *et al.* [12] demuestran que es posible conseguir una tolerancia completa con la dosis adecuada (Fig. 6), en este caso cuatro inyecciones de HLA-G sintético.

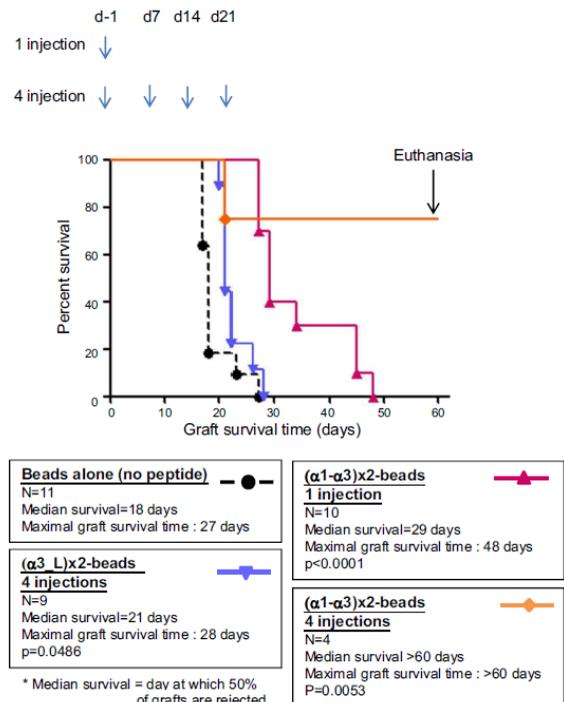


Fig. 6. El tratamiento con HLA-G exógeno incrementa la supervivencia tras un trasplante de piel en ratones. [12]

7. CONCLUSIONES

La complejidad del estudio del sistema inmunológico se acrecenta cuando el embarazo exige niveles de regulación adicional para la tolerancia al feto en desarrollo, mediante mecanismos locales, sistémicos, y diferenciales a lo largo del embarazo. Comprender estos mecanismos podría dar lugar a la aparición de nuevas herramientas terapéuticas para conseguir la inducción de tolerancia en los transplantes, como es el caso de HLA-G, de gran potencial.

REFERENCIAS

- [1] V. Hauk, C. Pérez Leirós, F. Baudou, R. Ramhorst, D. Papparini, E. Grasso and L. Fraccaroli, "Un nuevo enfoque del 'diálogo' materno-fetal: Los beneficios del reconocimiento de aloantígenos", *Química Viva*, vol. 10, no. 1, Apr 2011, pp. 18-28.
- [2] J.J. Bromfield, "Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 31, no. 6, pp. 627-636, Jun 2014, doi: 10.1007/s10815-014-0243-y.
- [3] J.E. Schjenken and S.A. Robertson, "Seminal fluid and immune adaptation for pregnancy--comparative biology in mammalian species", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 49, suppl. 3, pp. 27-36, Sep 2014, doi: 10.1111/rda.12383.
- [4] G.F. Clark and D.J. Schust, "Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract", *Frontiers in Immunology*, vol. 4, no. 26, pp. 1-14, Feb 2013, doi: 10.3389/fimmu.2013.00026.
- [5] Y.W. Loke and A. King, "Immunology of implantation", *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, vol. 14, no. 5, pp. 827-837, Oct 2000, doi: 10.1053/beog.2000.0122.
- [6] V. Rebmann, F. da Silva Nardi, B. Wagner and P.A. Horn, "HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy", *Journal of Immunology Research*, vol. 2014, no. 297073, pp. 1-16, Jul 2014, doi: 10.1155/2014/297073.
- [7] Y.Y. Xu, S.C. Wang, D.J. Li and M.R. Du, "Co-Signaling Molecules in Maternal-Fetal Immunity", *Trends in Molecular Medicine*, vol. 23, no. 1, pp. 46-58, Jan 2017, doi: 10.1016/j.molmed.2016.11.001.
- [8] T. Tilburgs, J.H. Evans, Â.C. Crespo and J.L. Strominger, "The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal-fetal interface", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 112, no. 43, pp. 13312-133127, Oct 2015, doi: 10.1073/pnas.1517724112.
- [9] B. Huang *et al.*, "Interleukin-33-induced expression of PIBF1 by decidual B cells protects against preterm labour", *Nature Medicine*, Dec 2016, doi: 10.1038/nm.4244. [Epub ahead of print]
- [10] O. Shynlova, T. Nedd-Roderique, Y. Li, A. Dorogin, T. Nguyen and S.J. Lye, "Infiltration of myeloid cells into decidua is a critical early event in the labour cascade and post-partum uterine remodelling", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 17, no. 2, pp. 311-324, Feb 2013, doi: 10.1111/jcmm.12012.
- [11] M.W. von Websky *et al.*, "Recombinant HLA-G as Tolerogenic Immunomodulant in Experimental Small Bowel Transplantation", *PLoS One*, vol. 11, no. 7, pp. 1-16, Jul 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158907.
- [12] J. LeMaoult, M. Daouya, J. Wu, M. Loustau, A. Horuzsko and E.D. Carosella, "Synthetic HLA-G proteins for therapeutic use in transplantation", *FASEB Journal*, vol. 27, no. 9, pp. 3643-3651, Sep 2013, doi: 10.1096/fj.13-228247.



Christian Carrizosa Balmont, estudiante de 4º curso del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide.

VACUNAS DE ARN: LA MÁS PROMETEDORA GENERACIÓN DE VACUNAS

María Coronada García Hidalgo

Resumen—Las vacunas son una de las principales herramientas para el tratamiento de enfermedades en la medicina moderna. Se han comercializado cinco tipos de vacunas: vivas atenuadas, muertas, recombinantes, recombinantes vivas y de ADN. El hecho de que ninguna combina las ventajas de las otras y que cada una presenta importantes inconvenientes, ha llevado al desarrollo de nuevas estrategias, entre las que se encuentran las vacunas de ARN, las cuales tienen capacidad de desencadenar una respuesta inmune eficaz y global, pero siendo seguras y de bajo coste. Así, están en estado preclínico y clínico para el tratamiento de importantes enfermedades como el cáncer, el VIH.

Palabras Claves—Vacuna, ADN, ARN, cáncer, VIH, alergia.

1. INTRODUCCIÓN

Una vacuna puede definirse como un preparado biológico que induce inmunidad frente a una enfermedad concreta, para la que ha sido diseñada.

[1]

Con la administración de la vacuna se pretende simular la invasión de un organismo patógeno y servirse, así, de la capacidad de este para responder de modo más rápido y eficaz ante antígenos que ya han sido reconocidos previamente. De esta manera los elementos biológicos de la vacuna son reconocidos vía receptores del sistema inmune innato, con lo que se desencadena una respuesta coordinada, que bien puede ser humoral, celular o ambas, y que conduce a la eliminación de estos, no sin antes formarse células de memoria, las cuáles son responsables del proceso de aprendizaje del sistema inmune. [1][2][3]

2. TIPOS DE VACUNAS

La naturaleza los elementos biológicos que conforman la vacuna será fundamental para determinar la eficacia, durabilidad y seguridad de las vacunas. En función de esto, se han venido fabricando principalmente cinco tipos de vacunas:

2.1. Vacunas vivas modificadas o atenuadas

El agente biológico que las constituye es el patógeno atenuado (con capacidad de dividirse, pero no virulento). La ventaja principal de este tipo de vacunas es su alta capacidad para inducir el sistema inmune (buena presentación antigénica e inducción de la respuesta celular y humoral), al replicarse, no estar apenas modificadas... También son más económicas, porque apenas requieren de investigación, y sus vías de administración son más sencillas, ya que la conservación de la capacidad de división asegurará que la vacuna se disemine por todo el organismo. Sin embargo, presentan el inconveniente de que el patógeno puede revertirse y volverse virulento. [3][4]

2.2. Vacunas muertas

Formadas por el patógeno inactivado o muerto (mediante calor, productos químicos), con lo que pierde la capacidad para dividirse y producir la enfermedad. Si bien estas vacunas son algo más seguras que las anteriores, la repuesta inmune es inferior y prácticamente carece de respuesta celular. [3][4]

2.3. Vacunas recombinantes

Consiste en la producción de manera heteróloga de componentes antigénicos del patógeno y su introducción como vacuna. Se pueden usar proteínas antigénicas aisladas o Virus-like particles (cápsida del virus sin ácido nucleico en su interior). Estas vacunas resultan mucho más seguras que las anteriores, sin embargo, su capacidad inmunogénica es mucho menor, ya que carecen de capacidad replicativa y no presentan todas las estructuras virales. Además, solo desencadenan respuesta humoral. [5]

2.4. Vacunas virales recombinantes

Constituidas por un virus vivo no virulento que actúa de vector y que porta secuencias de antígenos neutralizantes del patógeno. Estas vacunas imitan a las vivas atenuadas, con lo que tienen una buena respuesta inmune (no tan eficaz como las primeras) y son más seguras. El gran inconveniente de este tipo de vacunas es que su precio es muy elevado, ya que requieren de investigación, procesos de clonación... [6]

2.5. Vacunas de ADN

Formadas por secuencias de ADN que codifican para antígenos neutralizantes y que se insertan directamente en las células (normalmente miocitos). Se consigue una respuesta inmune muy eficaz y similar a la de las vacunas vivas y son muy sencillas y estables. La respuesta celular que desencadenan estas vacunas es especialmente significativa, ya que mimetizan a la perfección el

mecanismo de los patógenos intracelulares, presentando las células en las que se ha insertado el ADN los péptidos codificados por este. El gran inconveniente es ético, ya que suponen la fabricación de organismos transgénicos. Además, se desconocen efectos secundarios y consecuencias de que el ADN del patógeno se integre. [7]

Es evidente que las vacunas de ADN son una muy interesante opción con respecto al resto, prácticamente solo invalidadas por las cuestiones éticas que suscitan. Así, surgen las vacunas de ARN, intentando combinar los beneficios que aporta una vacuna de ADN, con la naturaleza transitoria de esta molécula.

3. VACUNAS DE ARN

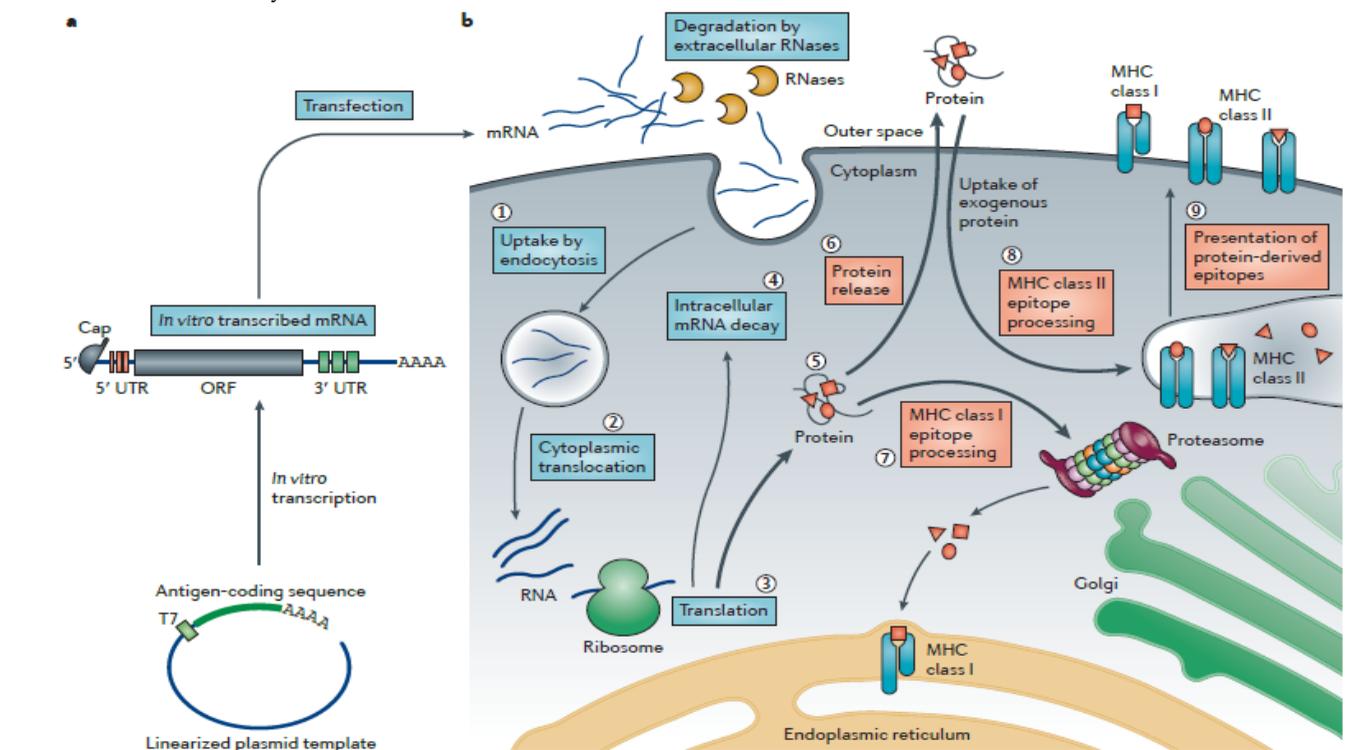
El primer evento de vacunación con ARN tiene lugar en 1995 para intentar prevenir el cáncer en ratones. En la actualidad las vacunas de ARN están en estado preclínico para el tratamiento del cáncer o algunas enfermedades infecciosas. Sin embargo, en la mayoría de los casos se encuentran en estado de investigación. [8][9]

3.1. Mecanismo de las vacunas de ARN

Este tipo de vacunas, al igual que las de ADN, requieren de un proceso inicial de investigación para hallar las secuencias que codifican para antígenos neutralizantes por el organismo hospedador. Este ADN se produce a gran escala y después se transcribe *in vitro* para producir el ARN que servirá como vacuna, el cual debe ser almacenado entre 2 y 8°C. Posteriormente, el ARN

músculo. Una parte de este ARN, dado que es extremadamente sensible, será degradado por RNAsas; el resto penetrará en el interior celular mediante endocitosis espontánea. El ARN liberado se une a la maquinaria de traducción de los miocitos y se generan los péptidos del organismo patógeno. Estos, en función de las señales que contengan y de la naturaleza de las células huéspedes, podrán permanecer en el interior celular y llevar a cabo sus funciones específicas o ser secretada al exterior celular y actuar a ese nivel. En el primero de los casos algunos de los péptidos del patógeno serán digeridos y presentados en la membrana celular por parte del MHC I que será, a su vez, reconocido por linfocitos T citotóxicos. Por el contrario, los péptidos secretados podrán ser fagocitados por APCs y expuestos en sus MHCII, los cuáles activan linfocitos T ayudantes por interacción específica (Fig 1). [8][9]

Las vacunas de ARN también pueden actuar a nivel del sistema inmune innato, ya que el ARN que conforma las vacunas al ser exógeno es reconocido por receptores de macrófagos, células dendríticas... Concretamente el ARN es reconocido por los receptores de tipo TLR3, TLR7 y TLR8, los cuáles se encuentran en los endosomas, donde normalmente el ARN natural perteneciente a los patógenos queda desnudo. En vacunas esta respuesta no está del todo caracterizada y no se conoce exactamente qué efectos produce. Se cree que puede actuar activando células dendríticas y macrófagos, los cuáles Esta respuesta no está muy detallada y apenas se conoce su mecanismo. Si bien se piensa que el ARN podría suponer



generado se transfecta normalmente a las células del la activación de células dendríticas y macrófagos al ser

Fig. 1. Mecanismo principal de una vacuna de ARN. [8]

reconocido por sus receptores, las cuáles conducirían a la activación de los linfocitos T ayudantes. Este mecanismo, combinado con el anterior, supondría una activación general del sistema inmune muy eficaz. [2][10]

3.2. Vacunas de ARN vs Vacunas de ADN

El mecanismo de acción de ambas vacunas es bastante similar, ya que en ambos tipos el ácido nucleico se inserta y a partir de él se generan los péptidos extraños, con lo que ambas desencadenan aproximadamente la misma respuesta inmune. Sin embargo, las vacunas de ARN presentan algunas ventajas con respecto a las de ADN. La principal es que las primeras son más seguras, ya que no existe el riesgo de que el ARN se inserte en el genoma y produzca la enfermedad o provoque una mutagénesis por inserción. Otra cuestión ventajosa de estas vacunas es que el ARN es transitorio, con lo cual al poco tiempo de su inserción, cuando se espera que haya conducido a la producción de células memoria, desaparecerá, por tanto, el organismo vacunado no podrá ser considerado transgénico. Otros aspectos interesantes es que se producen de manera rápida y poco costosa, con lo cual se pueden modificar fácilmente en función de la demanda o, en el caso, de que el tumor o el patógeno presenten mucha variabilidad. [9]

Las vacunas de ARN no están exentas de inconvenientes, de ahí que todavía no se hayan comercializado ni usado en la clínica. El peor aspecto de estas vacunas es que son muy sensibles ante el ataque de

ARNasas. Así, habrá que mantenerlas en frío (2-8°C) durante su almacenaje (lo que no ocurre con el ADN, que es mucho más estable) y pueden ser degradadas antes de ser endocitadas, con lo que no serían eficientes. Este problema se está intentando solventar bien modificando la cadena de ARN, haciéndola más estable, o bien uniéndola a complejos estables, como liposomas o protamina. [9][11]

3.2. Aplicaciones de las vacunas de ARN

Por su versatilidad y su bajo precio, las vacunas de ARN son especialmente interesantes para la prevención de enfermedades en las que las características moleculares varían mucho entre pacientes y a lo largo del tiempo, es decir, son un campo muy interesante en medicina personalizada. Habitualmente, las vacunas de ARN se pueden emplear inyectando directamente el ARNm al organismo, inyectándolo en células dendríticas in vitro y luego transfiriéndola al organismo o inyectándolo en linfocitos T in vitro y después introduciéndolos en el organismo. Son diversos campos en los que las vacunas de ARN se pueden aplicar (Fig 2):

- a. **Inmunoterapia del cáncer:** tratamiento del melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer del pulmón... Se encuentra tanto en estado preclínico como clínico. Se ha observado que el uso de las vacunas consigue que el tumor se estabilice y no crezca. Para su fabricación habría que tomar muestras de cada paciente y,

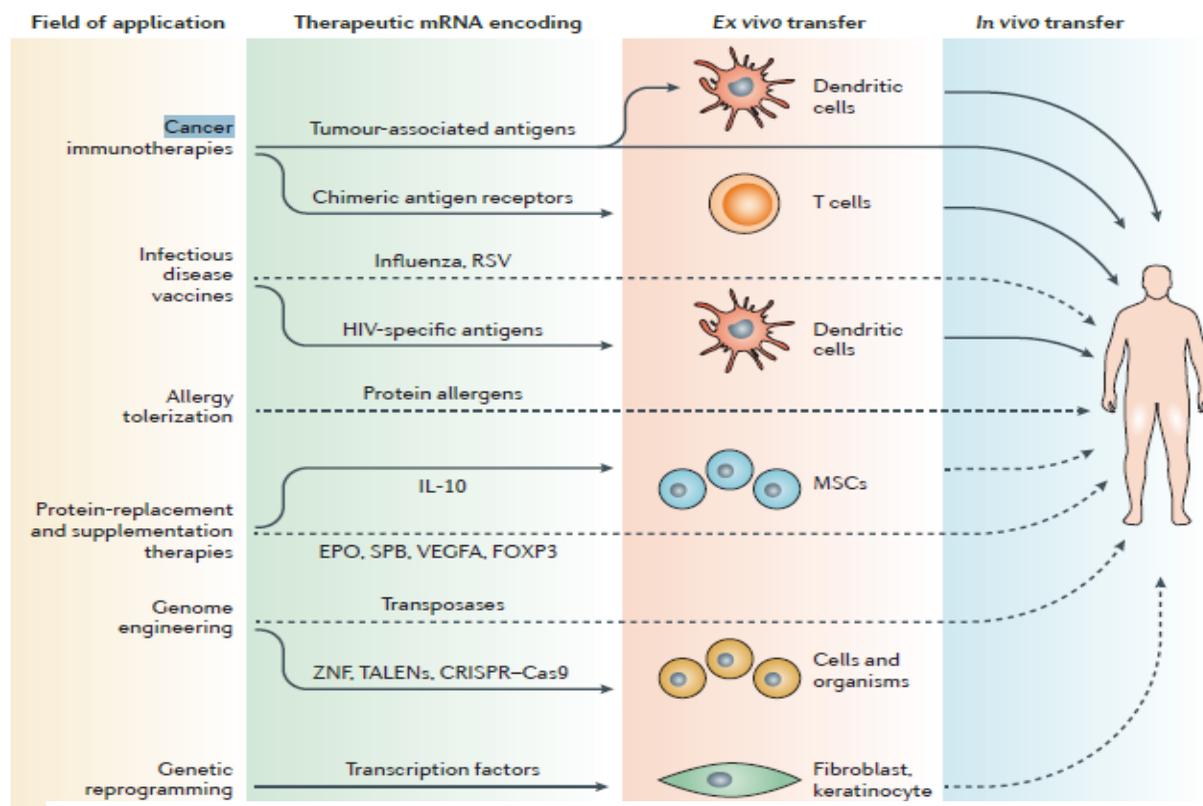


Fig. 2. Aplicaciones de las vacunas de ARN. [8]

a partir de las características de cada una de las células, diseñarlas.

- b. **Vacunas para enfermedades infecciosas.** En este sentido, cabe destacar especialmente la posibilidad de utilizar este tipo de vacunas de manera eficiente contra la rabia, el VIH..., en definitiva, enfermedades para las que no existe un tratamiento completamente efectivo. Por otra parte, estas vacunas podrían ser muy útiles para prevenir el virus de la Influenza. Este virus, al tener una alta tasa de mutación, suele requerir una nueva vacuna convencional cada año, con la mezcla de antígenos que se considere más prevalente esa temporada. No obstante, este proceso no es del todo óptimo, ya que el precio es elevado, requiere de mucho tiempo y no es completamente protectora. Usando vacunas de ARN de una mezcla de antígeno se solucionarían muchos de estos problemas.
- c. **Tratamiento para la alergia:** con alérgenos personalizados para cada paciente.
- d. **Reemplazo de proteínas mutadas.**
- e. **Ingeniería genética y edición del genoma.** [8][11][12]

Lucke, C.E., Weiner, D.B. (2011): Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clin Infect Dis*; 53(3): 296–302.

- [8] Sahin, U., Karikó, K., Türeci, O. (2014): mRNA-based therapeutics –developing a new class of drugs. *Nature Reviews, Drug Discovery*, Volume 13, 759-780.
- [9] Kreiter, S., Diken, M., Pascolo, S., Nair, S.K., Thielemans, K.M., Geall, A. (2016): RNA Vaccination Therapy: Advances in an Emerging Field. *J Immunol Res*. 2016; 2016: 9703914.
- [10] Kondili, M., Roux, M., Vabret, N., Bailly-Bechet, M. (2016): Innate immune system activation by viral RNA: How to predict it? *Virology*, 488, 169–178.
- [11] Web de Harvard University, <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/rna-vaccines-a-novel-technology-to-prevent-and-treat-disease/>
- [12] Petsch B., Schnee M., Vogel A. B., et al (2012): Protective efficacy of in vitro synthesized, specific mRNA vaccines against influenza A virus infection. *Nature Biotechnology*; 30(12): 1210–1216.

María Coronada García Hidalgo Estudiante de 4º del grado de Biotecnología de la Universidad Pablo de Olavide.

4. CONCLUSIÓN

La necesidad de encontrar tratamiento contra enfermedades que no lo tienen, así como el deseo de mejorar la eficacia del tratamiento de aquellas que sí lo tienen, ha llevado al desarrollo de nuevas vacunas, entre las que se encuentran las vacunas de ARN. Estas vacunas resultan muy interesantes, ya que combinan las ventajas de las vivas atenuadas con la seguridad de las recombinantes. Así, abren un nuevo mundo de posibilidades en campos como el cáncer o en enfermedades de gran variabilidad, como el SIDA o la gripe.

5. CONCLUSIÓN

- [1] Web de World Health Organization. <http://www.who.int/topics/vaccines/en/>
- [2] Vabret, N., Bhardwaj, N., Greenbaum, B.D. (2017): Sequence-Specific Sensing of Nucleic Acids. Volume 38, Issue 1, p53–65.
- [3] Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., Offit, P.A. (2008): Vaccines, pp 1-17. 5ª Edición. Elsevier.
- [4] Pattison, M. (2008): Poultry Diseases. 6ª Edición. Elsevier Health Sciences.
- [5] Morein, B., Helenius, A., Simons, K., Pettersson, R., Käriäinen, L., Schirmacher, V. (1978): Effective subunit vaccines against an enveloped animal virus. *Nature*, 276, 715 – 718.
- [6] Shiver et Al. (2002): Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415, 331-335.
- [7] Ferraro, B., Morrow, M.P., Hutnick, N.A., Shin, T.H.,

La pliometría como entrenamiento de las variables condicionales del rendimiento en futbolistas adolescentes.

Antonio Moreno Sánchez

Resumen— El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de un entrenamiento pliométrico (EP) en 6 semanas dentro de la práctica habitual de entrenamiento en jugadores de fútbol adolescentes. Veintisiete jugadores profesionales fueron asignados de forma aleatoria en dos grupos: grupo de control (GC) que entrenaba fútbol solamente y grupo de entrenamiento (GE) que entrenaba EP más entrenamiento habitual. Todos los jugadores entrenaban 3 veces por semana y el GE entrenaba también un programa de entrenamiento durante 30 minutos (2 días por semana). Sprint lineal de 20 metros, agilidad en 10 metros por lado derecho y por lado izquierdo y salto vertical se midieron antes y después del entrenamiento. El grupo experimental siguió un programa de entrenamiento de 6 semanas que incluían saltos, vallas, rebotes, skipping y comba, realizados antes del entrenamiento de fútbol. Las tres primeras semanas se entrenó pliometría vertical y las tres siguientes se entrenaron pliometría horizontal. No se encontraron diferencias significativas en el GC, sin embargo, se encontraron cambios significativos en el GE Sprint 10m (TE = 1,1), Salto vertical (TE = 0,3) y Agilidad en 10 m (TE = 0,5 – 0,6). El entrenamiento pliométrico combinado con el entrenamiento de fútbol mejora las acciones explosivas comparadas con el entrenamiento de fútbol convencional sin este entrenamiento. Por lo tanto, se puede demostrar que un programa combinado a corto plazo tiene un impacto beneficioso sobre las acciones explosivas que pueden ser determinantes en el rendimiento de este deporte como cambios de dirección, saltos y carreras.

Palabras Claves — Velocidad, saltos, tren inferior, volumen, intensidad, pliometría, fútbol, agilidad, fuerza explosiva.

1. INTRODUCCIÓN

La pliometría consiste en un rápido estiramiento del músculo (acción excéntrica) seguido inmediatamente por una acción concéntrica del mismo tejido conectivo [1], [2]. Son ejercicios que utilizan el ciclo de estiramiento-acortamiento (CEA) de la acción muscular. El CEA mejora la capacidad de los sistemas neuronales y musculotendinosos produciendo la mayor fuerza en el menor tiempo, es un puente entre la fuerza y velocidad [3]. El EP constituye una parte natural de los movimientos ya que estos implican acciones como saltar o brincar [4], acciones de otros deportes de equipo [5], [6], [7] o individuales [8], [9].

El EP parece ser un tipo de entrenamiento eficaz y válido para la mejora del salto vertical [8], [10], [11]. Además también se ha demostrado que el uso de pesos adicionales no causa aumentos significativos en el rendimiento [4], [12].

Por otra parte, parece ser que un volumen de al menos 10 semanas, con más de 20 sesiones y alrededor de 50 saltos por sesión, es la mejor estrategia para maximizar el rendimiento. Otro dato es que para obtener mayores mejoras es mejor combinar distintos tipos de EP, y que la mejor combinación es de SJs (Squat Jumps) + CMJs (Countermovement Jumps) + DJs (Drop Jumps) [4].

En otros estudios se ha demostrado que el EP combinado con sprint durante 9 semanas mostraron mejoras significativas en CMJ, salto abalakov, sprint 10m y agilidad en 10m con y sin pelota [13]. Apoyando a este estudio, recientes estudios y meta-análisis destacan que el EP produce mejoras significativas en el sprint [14], como

también en el cambio de dirección (COD) [15], sin embargo en sujetos adultos y ancianos vemos que el EP no produce mejoras en el sprint, aunque sí en el salto vertical [16].

En otro estudio, la potencia máxima, CMJ, SJ, MB5 (5 saltos múltiples), RRJ15 (saltos repetidos durante 15 seg.) y velocidad en 20m mejoraron en el grupo que hizo el entrenamiento pliométrico, aunque el volumen de entrenamiento era entre 200 y 300 saltos por sesión [17]. En controversia al anterior artículo, se ha evidenciado que volúmenes tan altos no son beneficiosos y que un entrenamiento durante 7 semanas con 2 sesiones por semana con un total de 840 saltos tenía mayores mejoras [7].

La agilidad también es un factor importante en los deportes de equipo. Recientes estudios destacan que un EP a corto plazo (6 semanas) producía mejoras en el test de agilidad T-Test y en el test de Illinois. En el entrenamiento que llevaron a cabo empezaba con un volumen de 90 contactos llegando a 140. Esto nos hace pensar que un entrenamiento a corto plazo y no con tantas semanas como los anteriores puede producir del mismo modo mejoras en la agilidad de los sujetos [18]. Otro estudio apoyando a este, pero durante 8 semanas y con una carga mayor (500 saltos a 1300 aproximadamente por semana), también mejoró la agilidad de los sujetos y el sprint [19].

Algo interesante es el uso del EP en deportes de equipo como es el caso del fútbol u otros. En deportes de equipo como fútbol, baloncesto, balonmano etc, los goles, puntos o acciones decisivas vienen precedidas por aceleraciones, sprints, jugadas explosivas, saltos y disparos

[20]. Es por esto que la pliometría podría jugar un papel muy interesante, ya que se está viendo que no solo mejora en la capacidad de salto, sino también en sprint o agilidad [11], [12], [18], [19], [22]. En determinados estudios de fútbol el EP mejoró el pico de potencia, el SJ, el CMJ, la velocidad en 40m, la potencia promedio y en todos los sprint, ya que se le realizaron distintos test de sprint [22], por lo que es una variable del entrenamiento que deberíamos de tener en cuenta y por eso la estudiamos.

Debe señalarse que factores como el nivel de condición física, el sexo o nivel de rendimiento no influye en las ganancias obtenidas en el entrenamiento pliométrico, obteniendo beneficios muy similares en distintos perfiles de deportistas [7].

La hipótesis de este estudio es demostrar si el entrenamiento pliométrico (EP) puede mejorar la agilidad, el salto vertical y la velocidad lineal en futbolistas adolescentes.

2. METODOLOGÍA

2.1. Aproximación experimental al problema

El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de 6 semanas de EP sobre la capacidad de salto, la velocidad en 20mlis y la agilidad en test de slalom 60° de 10m en futbolistas de categoría cadete e infantil. Se formaron dos grupos, un grupo era el grupo que se le modificaba el entrenamiento regular para incluirle el EP (Grupo experimental, GE) y el otro siguió el entrenamiento habitual (Grupo de control, GC).

Todos los participantes realizaron el pretest antes de

las 6 semanas de entrenamiento y después el posttest. Todas las pruebas fueron realizadas en la misma sesión, dando suficiente descanso entre una y otra para no acumular fatiga, con una duración de 90 minutos. El GE asistió a 2 sesiones por semana durante las 6 semanas de EP, con una duración de 30 minutos por sesión al principio de la sesión habitual de entrenamiento.

2.2. Sujetos

Se contó con la muestra de 27 sujetos, con una edad media de $14,73 \pm 0,59$ años, una estatura media de $164,25 \pm 6,27$ cm y un peso medio de $58,9 \pm 10,69$ kg. 14 jugadores fueron incluidos en el GE y 13 jugadores fueron incluidos en el GC. Ninguno de los sujetos tenía experiencia en el entrenamiento de fuerza.

2.3. Procedimientos de pruebas iniciales

Test de sprint lineal 20m: Se colocaron 2 conos separados entre sí por 1m en la línea de 0 metros y otros 2 en la línea de 20m. Los registros fueron tomados con un cronómetro convencional y grabado para su posterior análisis mediante Kinovea (0.8.15 para Windows).

Test de agilidad: Consistía en cuatro cambios de dirección de 60 grados sobre 10m. La toma de datos siguió el mismo procedimiento que el test de sprint de 20m. Todos los sujetos realizaron este test primero empezando por la derecha y después lo repitieron pero empezando por la izquierda, para ver también si existía lateralidad entre ambas piernas. Se seleccionó esta prueba ya que requiere aceleraciones, desaceleraciones y control del equilibrio en situaciones reducidas propias del fútbol [19].

TABLA 1
PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO PARA EL GRUPO EXPERIMENTAL

PLIOMETRÍA VERTICAL

Ejercicios	Semana 1	Ejercicios	Semana 2	Ejercicios	Semana 3
½ Squat Jump	2 x 8	½ Squat Jump	2 x 10	Salto rodilla pecho	2 x 10
SAQ (Hopscoch)	2 x 10	Salto frontal (20cm)	2 x 12	Salto frontal (20cm)	2 x 12
Salto monopodal (10cm)	2 x 8	Salto monopodal (20cm)	2 x 12	Salto lateral monopodal	2 x 10
Salto lateral (10 cm)	2 x 10	Salto lateral (20cm)	2 x 12	Salto zigzag (20cm)	2 x 12
Salto zigzag (10 cm)	1 x 8	Salto zigzag (20cm)	2 x 4	Salto frontal (30 y 40 cm)+ cabeza	2 x 5 + 2
Total	80 saltos		100 saltos		96 saltos

PLIOMETRÍA HORIZONTAL

Ejercicios	Semana 4	Ejercicios	Semana 5	Ejercicios	Semana 6
Salto comba	1 x 50m	Skipping medio	2 x 50 m	Skipping alto	2 x 50m
Skipping medio	1 x 50m	Salto frontal (1,40m)	2 x 12	Salto frontal (1,50m)	3 x 10
Salto frontal (1,20m)	2 x 10	Salto monopodal (1,20m)	2 x 12	Salto monopodal (1,20m)	3 x 10
Salto monopodal (1,20m)	2 x 10	Salto tobillos frontal (1,20m)	2 x 10	Salto tobillos frontal (1,20m)	2 x 12
Salto diagonal (1 m)	2 x 10	Salto diagonal (1,20m)	2 x 10	Salto diag. (1,20m) + horiz. Máx.	2 x 12 + 2
Total	168m		210m		242m

* ½ Squat Jump= El grado de flexión de rodilla era por encima de 90°; Salto rodilla pecho= Salto hasta juntar la rodilla con el pecho; Salto frontal = salto con pies juntos hacia el frente; Salto monopodal = salto con solo un pie de apoyo hacia el frente; Salto lateral = Salto con los pies juntos de forma lateral; Salto lateral monopodal = Salto con los pies juntos de forma lateral y con un solo pie de apoyo; Salto zigzag = Salto en zigzag de altura; Skipping medio = las rodillas alcanzan una flexión aproximadamente de 60°, sin llegar a la altura de la cadera; Skipping alto = Las rodillas llegan a la altura de la cadera.

El número entre paréntesis en el caso de pliometría vertical significa la altura a la que saltaban. El número entre paréntesis en el caso de pliometría horizontal significa la distancia de separación entre salto.

Test de salto vertical: Se calculó la altura del salto vertical a través del tiempo de vuelo. Estos registros fueron obtenidos mediante una grabación y analizados a través de la aplicación de Iphone "my jump" (XCode 5.0.5 para Mac OSX 10.9.2; Apple Inc., USA).

2.4. Procedimientos de entrenamiento

Se entrenaba 2 días por semana. Durante las primeras 3 semanas fue pliometría vertical y las últimas 3 de pliometría horizontal, con un orden ascendente de forma progresiva en intensidad y volumen. Las series no duraban más de 15 segundos, habiendo un descanso entre series de 70-90 segundos para tener una recuperación completa. En la tabla 1 se muestra el entrenamiento llevado a cabo.

2.5. Análisis estadístico

Los estadísticos descriptivos (mean \pm SD) de las diferentes variables fueron calculados. Se analizó mediante una prueba T para muestras relacionadas los valores pre-test y post-test de los grupos GE & GC para observar las diferencias intragrupo en cada una de las variables. Se analizó posteriormente mediante ANOVA de un factor las diferencias intergrupo en pre-test y post-test. Las diferencias significativas fueron aceptadas con un nivel alfa de $p \leq 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron en SPSS para Windows 10 (versión 20, SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

3. RESULTADOS

Sprint lineal: se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el test de sprint de 20 m lineales en el GE (-0,19 segundos, 5,5%, TE=1,1) y también entre grupos.

Salto vertical: Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) se observaron en el grupo de entrenamiento (GE) después del entrenamiento en salto vertical (centímetros) (2,9 cm, 7,1%, TE = 0,3) y entre grupos.

Test de agilidad: también se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el GE empezando por el lado izquierdo [GE (-0,15 segundos, 2,7%, TE = 0,6)] y empezando por el lado derecho [GE (-0,16 segundos, 2,8%, TE = 0,5)]. Diferencias significativas fueron observadas entre el GE y GC. Los resultados se muestran en la tabla 2.

4. DISCUSIÓN

Estos resultados apoyan la mayoría de los estudios publicados recientemente respecto a este tipo de intervenciones en deportistas jóvenes [6], [8], [13], [20]. Aunque sí es verdad que también en muchos de los estudios los sujetos son pre-púberes o adultos y también suele ser un entrenamiento de mayor duración y no tan a corto plazo [20], [4].

Este tipo de mejoras podría tener un efecto positivo en la influencia del rendimiento del juego y la capacidad para determinar resultados en la competición. No olvidemos que acciones tan determinantes como un sprint o un salto de cabeza pueden hacernos generar un gol que determine la victoria de nuestro equipo o evitar que el contrario pueda conseguirla. Varios estudios también demostraron que el EP mejoraba en el sprint lineal en jóvenes [8], [6], aunque también alguno de ellos lo hacía combinado con ejercicios de sprint y no solo EP. Este estudio también demuestra que se puede mejorar el sprint lineal, obteniendo mejoras significativas (-0,19 segundos, 5,5%) respecto al grupo de control. Por otra parte hay estudios en controversia con estos resultados, no pudiendo incrementar la velocidad en sprint lineal [7]. La discrepancia entre los resultados de este estudio y el anterior puede ser debido a varias razones: diferencias en la duración del entrenamiento, cargas y volúmenes más altos, la especificidad de la formación y la capacidad atlética, ya que los sujetos del anterior estudio eran muy mayores.

Muchos estudios han mostrado la eficacia del EP en la mejora del salto vertical [4], [5]. En este estudio, también ha habido mejoras en el salto vertical respecto al grupo de control (2,9 cm, 7,1%) aunque el procedimiento de medición fue distinto para aumentar aún más la especificidad de este deporte. Por esta razón, la mejora en la capacidad de salto en este estudio parece ser que es razonable, esto puede ser debido a un cambio en el nivel de activación neuromuscular, respondiendo al EP [3]. Hay que destacar que en este estudio se utilizan unos volúmenes de saltos entre 80-100 como han corroborado algunos meta análisis [4] ya que producen mayores mejoras y no volúmenes tan altos [20].

Respecto a la agilidad en los futbolistas, la prueba de 10 metros parece ser que es una de las pruebas más relevantes para evaluar la agilidad específica en el fútbol debido a que en la mayoría de las situaciones de alta inten-

TABLA 2

RESULTADOS DE TEST SPRINT 20 M, TEST DE SALTO VERTICAL Y TEST DE AGILIDAD (MEAN \pm SD). * χ

	Grupo entrenamiento (GE)				Grupo control (GC) (n=13)			
	Pre-T	Post-T	% Δ	TE	Pre-T	Post-T	% Δ	TE
Sprint (s)	3,47 \pm 0,2	3,28 \pm 0,2* χ	5,5	1,1 \pm 0,9	3,58 \pm 0,2	3,66 \pm 0,2	-2,5	-0,5 \pm 1,3
Agilidad D (s)	5,15 \pm 0,3	4,99 \pm 0,3 * χ	2,8	0,5 \pm 0,9	5,23 \pm 0,2	5,37 \pm 0,3	-2,8	-0,6 \pm 1,3
Agilidad I (s)	5,31 \pm 0,3	5,16 \pm 0,2 * χ	2,7	0,6 \pm 0,8	5,40 \pm 0,2	5,46 \pm 0,3	-1,1	-0,3 \pm 1,1
SV (cm)	48,2 \pm 8,9	51,1 \pm 8,12* χ	7,1	0,3 \pm 0,5	43,7 \pm 6,9	42,8 \pm 6,8	-2,1	-0,1 \pm 0,3

Pre-T = Pre-entrenamiento; Post-T = Post-entrenamiento; % Δ = Diferencia entre Post-T y Pre-T (%); TE = Tamaño del efecto.

Sprint = Sprint lineal 20m; Slalom D = Slalom empezando por lado derecho; Slalom I = Slalom empezando por lado izquierdo; SV = Salto vertical.

* Diferencias significativas entre el pre-entrenamiento y post-entrenamiento ($p \leq 0,05$)

χ Diferencias significativas respecto al GC ($p \leq 0,05$).

sidad en fútbol suelen ser con carreras cortas y slalom en distancias reducidas. Los estudios anteriores han demostrado que el EP mejora la agilidad en jóvenes [15], [19], [13]. En este caso, en los resultados obtenidos tras el presente estudio vemos que también corroboran a los anteriores obteniendo mejoras significativas (-0,15 segundos, 2,7% y -0,16 segundos, 2,8%) respecto al grupo de control. Hay que destacar que en el entrenamiento llevado a cabo los EP contenían determinados movimientos laterales con cambios de dirección y zigzag, pudiendo tener un mayor impacto en la capacidad de mejora de la agilidad.

Estos datos demuestran que la adición de un EP combinado con el entrenamiento habitual de fútbol regular en jugadores adolescentes parece ser un buen estímulo para mejorar el salto, la agilidad en distancias cortas y la velocidad lineal.

REFERENCIAS

- [1] T. R. Baechle and R.W. Earle, *Essentials of strength training and conditioning*. United States of America: National Strength and Conditioning Association, 2008.
- [2] J. G. Markovic. "Does plyometric training improve vertical jump height? A meta-analytical review". *British Journal of Sports Medicine*, vol 41, no 16, pp 349-55, 2007.
- [3] G. Markovic and Mikulic, P. "Neuro-musculoskeletal and performance adaptations to lower-extremity plyometric training". *Sports medicine*, vol 40, no 10, pp 859-895, 2010
- [4] E. Sáez de Villarreal, E. Kellis, W. J. Kraemer and M. Izquierdo. "Determining variables of plyometric training for improving vertical jump height performance: a meta-analysis". *Journal of Strength and Conditioning Research*, vol 23, no 12, pp 495-506, 2009.
- [5] N. Adibpour, H.N. Bakhtand N. Behpour. "Comparison of the effect of plyometric and weight training programs on vertical jumps in female basketball players". *World Journal of Sport Sciences*, vol 7, no 2, pp 99-104, 2012.
- [6] S. Harmandeep, K. Satinder, R. Amita and S. Anupriya. "Effects of six-week plyometrics on vertical jumping ability of volleyball players". *Research Journal of Physical Education Sciences*, vol 3, no 4, pp 1-4, 2015.
- [7] E. Sáez de Villarreal, B. Requena, F. Arampatzí and K. Saloniki- dis. "Effect of plyometric training on chair-rise, jumping and sprinting performance in three age groups of women". *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* vol 50, no 39, pp 1-8, 2010.
- [8] J. Fernández-Fernández, E. Sáez de Villarreal, D. Sanz-Rivas and Moya, M. "The effects of 8-week plyometric training on physical performance in young tennis players". *Pediatric Exercise Science*, vol 28, no 1, pp 77-86, 2016.
- [9] A. Singh, A. V. Boyat and J.S. Sandhu. "Effect of a 6 week plyometric Training program on agility, vertical jump height and peak torque ratio of indian taekwondo players". *Sport and Exercise Medicine Open Journal*, vol 1, no 2, pp 42-46, 2015.
- [10] K. Adams, J.P. O'Shea, K. L. O'Shea and M. Climstein. "The effect of Six Weeks of Weeks of Squat, Plyometric and Squat- Plyometric Training on Power Production". *Journal of Applied Sport Science Research*, vol 6, no 1, pp 36-41, 1992.
- [11] M. S. Chelly, S. Hermassi, R. Aouadi and R. J. "Effects of 8-week in-season plyometric training on upper and lower limb performance of elite adolescent handball players". *Journal of Strength and Conditioning Research*, vol 28, no 5, pp 1401-1410, 2014.
- [12] E. Sáez de Villarreal, J.J. González-Badillo and M. Izquierdo. "Low and moderate plyometric training frequency produces greater jumping and sprinting gains compared with high frequency". *Journal of Strength and Conditioning Research*, vol 22, no 3, pp 115-725, 2008.
- [13] E. Sáez de Villarreal, L. Suarez-Arrones, B. Requena, G.G. Haff and C. Ferrete. "Effects of plyometric and sprint training on physical and technical skill performance in adolescent soccer players". *Journal of Strength and Conditioning Research*, vol 29, no 7, pp 1894-1903, 2015.
- [14] E. Sáez de Villarreal, B. Requena and J.B. Cronin. "The effects of plyometric training on sprint performance: a meta-analysis". *Journal of Strength and Conditioning Research*, vol 26, no 2, pp 575-584, 2012.
- [15] A. Asadi, H. Arazi, W.B. Young and E. Sáez de Villarreal. "The effects of plyometric training on change-of-direction ability: A Meta-Analysis". *International Journal of Sports Physiology and Performance*, vol 11, no 5, pp 563-573, 2016.
- [16] E. Sáez de Villarreal, B. Requena, F. Arampatzí and K. Saloniki- dis. "Effect of plyometric training on chair-rise, jumping and sprinting performance in three age groups of women". *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, vol 50, no 39, pp 1-8, 2010.
- [17] O. Diallo, E. Dore, P. Duche and E. Van Praagh. "Effects of plyometric training followed by a reduced training programme on physical performance in prepubescent soccer players". *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, vol 41, no 3, pp 342- 348, 2001.
- [18] M.G. Miller, J.J. Herniman, M.D. Ricard, C.C. Cheatham and T.J. Michael. "The effects of a 6-week plyometric training". *Journal of Sports Science and Medicine*. vol 5 no 3, pp 459-465, 2006.
- [19] C. Meylan and D. Malatesta. "Effects of in-season plyometric training within soccer practice on explosive Actions of young players". *Journal of Strength and Conditioning Research*, vol 23, no 9, pp 2605-2613, 2009.
- [20] M. Cherif, M. Said, S. Chaatani, O. Nejlaoui, D. Gomri and A. Abdallah. "The effect of a combined high-intensity plyometric and speed training program on the running and jumping ability of male handball players". *Asian Journal of Sports Medicine*, vol 3, no 1, pp 21-28, 2012.
- [21] M. Souhail, M.A. Ghenem, A. Khalil, S. Hermassi, Z. Tabka and R.J. "Effects of in-season short-term plyometric training program on leg power, jump and sprint performance of soccer players". *Journal of Strength and Conditioning Research*, vol 24, no 10, pp 2670-2676, 2010.



Antonio Moreno Sánchez recibió el título de Graduado en Ciencias de la Actividad Física y del Deporte por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, en 2016. Actualmente cursa el máster de profesorado en educación secundaria, formación profesional y enseñanza de idiomas en la especialidad de Educación Física, por la Universidad de Jaén.

Uso de fotobiorreactores para la generación de biocombustibles

Ana Belén Herrera Campos

Resumen—La necesidad de una fuente de energía renovable ha llevado a la generación de fotobiorreactores. La utilización de microalgas para la obtención de energía es considerada una gran alternativa, debido a sus propiedades. Para la formación de energía a partir de microalgas en los fotobiorreactores, tienen lugar una serie de conversiones termoquímicas y biológicas. Además, a partir de las microalgas se pueden obtener una gran variedad de biocombustibles, desde biodiésel a biometano. No obstante, para que esta fuente de energía sea factible, se trabaja en la optimización de estos aparatos, donde tiene gran relevancia el papel de la luz.

Palabras Claves— Fotobiorreactor, microalgas, termoquímica, bioquímica, biocombustible, optimización.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, nos encontramos frente a dos tipos de problemas importantes, problema medioambiental y crisis energética. El problema medioambiental es el calentamiento global, sabemos que el uso de los combustibles fósiles ha favorecido este calentamiento global; por otra parte, en la crisis energética, el aumento de los precios globales del petróleo crudo tiene impactos en las situaciones de energía doméstica, así como en la vida de la sociedad. Por tanto, para resolver estos problemas, es necesario el desarrollo de una energía renovable. El uso de una energía proveniente de la biomasa podría contribuir a un suministro estable de energía y favorecería a la sociedad debido a un aumento en las actividades comerciales. [1]

Aquí entra en juego el papel de los fotobiorreactores. Los fotobiorreactores son reactores con tecnología específica de gran complejidad que permiten cultivar microorganismos fotosintéticos, los cuales son reconocidos hoy en día como una alternativa, junto con otros orígenes de biomasa, a la desaparición de los recursos fósiles. Asumiendo todas las condiciones fisiológicas necesarias en condiciones óptimas (pH, temperatura, presencia de carbono inorgánico,...), los fotobiorreactores realizan procesos que se rigen por el transporte de luz radiante, la cual determina todas las actuaciones y se convierte en un fenómeno crítico para la concepción de fotobiorreactores de gran tamaño.[2]

La energía producida en estos fotobiorreactores tiene lugar a través de dos tipos de conversiones, termoquímicas y biológicas.

Dentro de las conversiones termoquímicas encontramos:

Gasificación: Es un proceso químico en el cual materiales carbonados son convertidos en gases sintéticos debido a una oxidación parcial con aire, oxígeno y vapor de agua a temperaturas elevadas (800-900°C).[1]

Licuefacción: Para llevar a cabo este proceso, en el cual se obtiene un combustible líquido (el aceite), son buenos materiales los precipitados celulares de

microalgas derivados de la centrifugación que poseen un alto contenido en humedad. El proceso de obtención del aceite está esquematizado en la figura 1.[1]

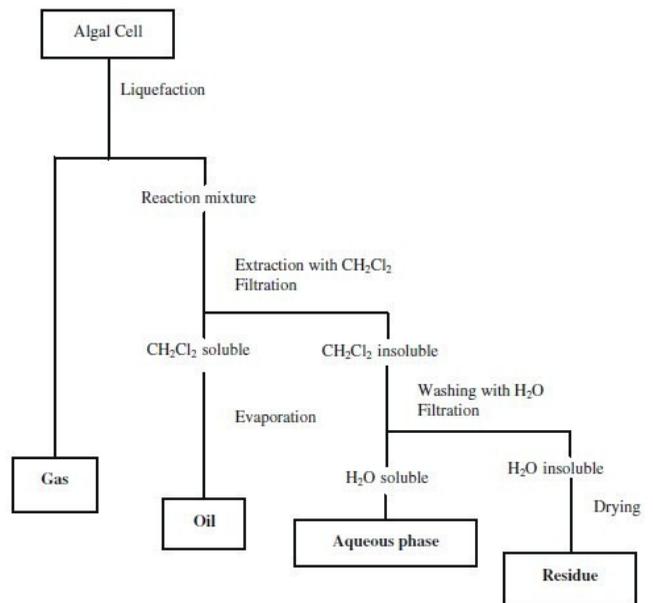


Fig.1 Esquema de separación para licuar células de microalgas [1].

Pirólisis: A través de un proceso cíclico, la biomasa se transforma en biocombustible, carbón y fracción gaseosa, en dicho proceso se requiere energía en forma de calor. El gas obtenido puede ser usado para procesos de secado del material crudo o para aportar calor en la pirólisis.[1]

Hidrogenación: Es una reacción química reductiva que consiste en la adición de átomos de hidrógeno a los dobles enlaces de una molécula a través de un catalizador. Mediante este proceso se obtienen hidrocarburos líquidos a partir de las algas.[1]

2. BIOCOMBUSTIBLES A PARTIR DE MICROALGAS

Las microalgas, al ser procesadas a través de reacciones químicas o biológicas, pueden proporcionar diferentes

tipos de combustibles renovables. Donde se encuentran el bioetanol, biodiésel, biohidrógeno y biometano.

Dentro de las conversiones bioquímicas encontramos:

Fermentación: Es una reacción en la cual se obtiene como producto de las microalgas el etanol. La producción de etanol a partir de microalgas como material crudo puede ser desarrollado según el siguiente proceso, en un primer paso el almidón de las microalgas es liberado de las células, cuando las células comienzan a degradarse se añade la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para iniciar la fermentación. El etanol producido se drena del tanque y se bombea a un tanque de retención para ser proporcionado a una unidad de destilación.[1] El bioetanol puede considerarse como una combustión limpia alternativa, ya que sus productos de combustión son respetuosos con el medio ambiente, con una baja influencia sobre el efecto invernadero en comparación con los combustibles fósiles.

Las microalgas pueden producir bioetanol mediante la fermentación de la biomasa de microalgas o directamente a través de reacciones celulares.

A través de la fermentación, la clave es la acumulación de almidón debido a que es un sustrato potencial. Actualmente se está investigando en la mejora de la producción de bioetanol a través de microalgas por manipulaciones genéticas.[3]

Transesterificación: Es una reacción en la que una grasa o aceite con un alcohol forman ésteres y glicerol, el alcohol se combina con los triacilglicérols para formar glicerol y ésteres. El resultado de esta transesterificación es la formación de biodiésel, para un mayor rendimiento el alcohol debe de ser usado en exceso. En la figura 2 observamos el proceso de formación de biodiésel, en primer lugar por un aumento de temperatura se elimina el contenido en agua del aceite, posteriormente se genera metóxido de sodio que se mezclará con el aceite limpio, esta mezcla será transferida a un aparato ultrasónico donde se mezclará, a continuación se produce el proceso de separación, el biodiésel se encontrará en la capa más alta, mientras que la glicerina se encontrará en la capa baja. Por último el biodiésel es lavado, secado y luego se prueba la calidad. [1]

Las microalgas pueden producir diversos tipos de lípidos, incluyendo lípidos neutrales, lípidos polares, ésteres, esteroides e hidrocarburos, además de derivados de prenilo tales como tocoferoles, carotenoides, terpenos, quinonas y derivados de pirrol fitilados como clorofilas. Estos lípidos tienen una diversa composición de ácidos grasos con elevados niveles de insaturación, el tamaño y el nivel de insaturación de los ácidos grasos juega un papel importante en la calidad del biodiésel. Un biodiésel de alta calidad debe de tener un buen rendimiento a baja temperatura y estabilidad oxidativa. La obtención de biodiésel se puede obtener por reacciones químicas o biológicas.

La catálisis biológica tiene ventajas sobre la catálisis química, entre las cuales encontramos: menor demanda

de energía, condiciones moderadas de reacción, menor proporción de alcohol en aceite, mayor recuperación del producto y alta conversión; además para gestionar sus limitaciones se llevan a cabo diversos métodos como la inmovilización de las lipasas en reactores de lecho empacados para prevenir el lavado y la inactivación, métodos no catalíticos bajo condiciones super críticas, o procesos a alta presión para estabilizar a las enzimas. No obstante, desde un punto de vista económico, la catálisis química tiene un coste menor que la catálisis biológica. Pero las modificaciones como el uso de biocatalizadores inmovilizados y la reutilización mejorada puede ayudar a un coste competitivo en comparación con los catalizadores químicos.[3]

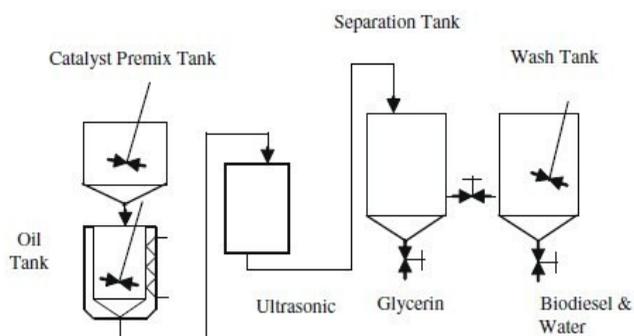


Fig.2 Proceso de formación de biodiésel [1].

Otro biocombustible que se puede obtener a partir de microalgas a través de estas conversiones es el biohidrógeno, éste gracias a sus propiedades es aceptado para ser un renovable, sostenible y ecológico portador de energía que constituye una de las más prometedoras soluciones alternativas para superar las preocupaciones ambientales considerando las futuras demandas de energía. A pesar de que la producción de hidrógeno es dominada por los procesos químicos, los procesos biológicos comenzaron a tener más importancia a partir de 1920 cuando comenzaron los primeros estudios.

La reacción llevada a cabo por las microalgas es la siguiente:

- (a) Fotólisis directa: $2\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{luz}} 2\text{H}_2 + \text{O}_2$
- (b) Fotólisis indirecta:
 - (1) $12\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2 \xrightarrow{\text{luz}} \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$
 - (2) $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 12\text{H}_2\text{O} \rightarrow 12\text{H}_2 + 6\text{CO}_2$

Debido a su productividad fotosintética y la eficiencia en la utilización de la luz, las microalgas pueden desarrollar reacciones bioquímicas y fotoquímicas especiales con requerimientos mínimos que hacen posible la producción de hidrógeno bajo condiciones aerobias y anaerobias.

Las microalgas utilizan dos tipos de metaloenzimas sensibles a oxígeno, nitrogenasas e hidrogenasas, que están muy relacionadas con la producción final de biohidrógeno en la fotosíntesis. Las nitrogenasas se encargan de la fijación del nitrógeno, mientras que las hidrogenasas son capaces de catalizar las reacciones que consumen hidrógeno, siendo estas últimas las más eficientes de las dos. Dado que ambas enzimas son

sensibles a oxígeno, es importante controlar las condiciones de cultivo para una óptima producción de hidrógeno.

La producción de biohidrógeno a partir de microalgas puede tener lugar durante la fotosíntesis del agua por los dos fotosistemas, fermentación oscura del carbono reducido producido por la fotosíntesis y fotofermentación por oxidación enzimática de reductores intracelulares derivados de la fermentación.[3]

El biometano también se obtiene a partir de las microalgas. La energía solar, puede ser utilizada a través de la fotosíntesis para ser transformada en la digestión anaeróbica y generar el metano.

A partir de un modelo predictivo de la digestión de biomasa de microalgas para producir energía eléctrica y térmica, se discutió el rendimiento económico relacionado con aspectos técnicos del sistema de producción. Los resultados mostraron que la productividad de las microalgas, la recolección, la concentración y el uso de digestores anaeróbicos de alta velocidad son la clave para la producción de energía económica. [3]

Hay que tener en cuenta que existen muchos parámetros que afectan al crecimiento de las algas como son una fuente de energía, una fuente de carbono (generalmente CO₂) y nutrientes (entre los que destaca el nitrógeno). La luz es la fuente de energía, y su disponibilidad depende principalmente de la proximidad a la fuente de luz. Un crecimiento eficiente es posible en un área del reactor donde la luz es abundante, pero no excesiva, ya que un exceso de luz puede provocar fotoinhibición. Si la mezcla es suficiente, el efecto de luz intermitente disminuye esta inhibición, las células experimentan la alta intensidad sólo por un corto período de tiempo determinado por la dinámica de flujo del sistema. [4]

Las algas que se encuentran en la capa superior captan mejor la luz y la utilizan para mantener su actividad fotosintética para lo cual necesitan disipar energía y reparar los complejos fotoinhibidos, por lo cual utilizan la luz con una eficiencia más baja, además, la sombra creada por las células de algas producen limitación en el crecimiento. Para acabar con este problema se utiliza ingeniería genética, una posible estrategia que se encuentra bajo intenso estudio en los fotobiorreactores es disminuir el tamaño de las antenas de los fotosistemas (LHC), las cuales se encargan de la captación de la luz[5]. La intensidad de la luz en un fotobiorreactor y la irradiancia que experimentan las microalgas puede ser calculada de diversas maneras. La opción más simple sería calcular la media de la intensidad de la luz en el reactor y vincularlo al crecimiento de dichas microalgas. No obstante hay que tener en cuenta que las zonas oscuras en el reactor limitan el crecimiento, por ello, es común considerar un perfil de tiempo-irradiancia para la biomasa en el reactor. La metodología requiere separar en el reactor una zona oscura y una zona con luz, teniendo lugar un ciclo entre ambos lugares y que el tiempo en

cada zona sea controlado.[4] Esto lo podemos observar en la figura 3.[5]

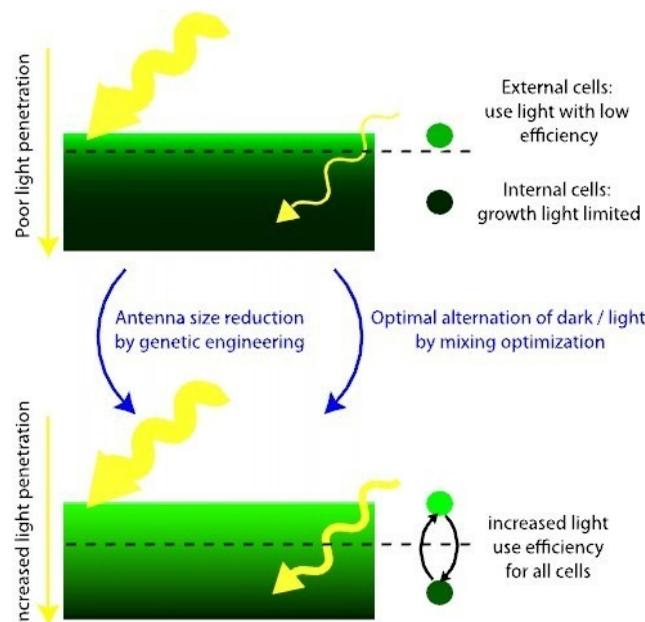


Fig.3 Optimización de la luz en fotobiorreactores [5].

3. CONCLUSIONES

El uso de microalgas para la obtención de biocombustibles parece una alternativa viable, ya que éstas crecen rápidamente y pueden duplicar su biomasa más de ocho veces en un día durante un crecimiento exponencial. Las microalgas son productores eficientes de aceites naturales; secuestran dióxido de carbono, reduciendo así los gases de efecto invernadero, y no afectan al suministro de alimentos (como si ocurre con el uso de plantas de cultivo) ni agotan los nutrientes del suelo.[6]

Basándonos en las consideraciones económicas, es necesario un buen planteamiento de los sistemas e instalaciones para la producción de microalgas para que ésta sea una fuente de energía factible. A pesar de que parece que haya que afrontar una crisis económica y un problema en la comercialización, el alivio en las cuestiones éticas permite considerar esta fuente como una fuente ecológica, limpia y sostenible para el futuro. [3]

La obtención de energía en un futuro a partir de estos microorganismos podría ser una gran alternativa, a parte de ser una fuente respetuosa con el medio ambiente, usarían la luz solar, además, la presencia de microalgas es muy abundante, ya que pueden encontrarse tanto en ríos, océanos, mares... Por tanto, siempre podría conseguirse energía a pesar de la desaparición de los combustibles fósiles.

REFERENCIAS

- [1] Amin, S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 50(7),1834-1840. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.001>

- [2] Universite, C. (2010). Calculation of optimal design and ideal productivities of volumetrically lightened photobioreactors using the constructal approach, 65, 985-998. <http://doi.org/10.1016/j.ces.2009.09.052>
- [3] Oncel, S. S. (2013). Microalgae for a macroenergy world. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26, 241-264. <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.059>
- [4] Nauha, E. K., & Alopaeus, V. (2013). Modeling method for combining fluid dynamics and algal growth in a bubble column photobioreactor. *Chemical Engineering Journal*, 229, 559-568. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.065>
- [5] Simionato, D., Basso, S., Giacometti, G. M., & Morosinotto, T. (2013). Biophysical Chemistry Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophysical Chemistry*, 182, 71-78. <http://doi.org/10.1016/j.bpc.2013.06.017>
- [6] Csavina, J. L., Stuart, B. J., Riefler, R. G., & Vis, M. L. (2011). Growth optimization of algae for biodiesel production, 312-318. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05064.x>



Ana Belén Herrera Campos estudiante del segundo curso del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Optofarmacología: fármacos fotoinducibles

Alicia Ortega Rodríguez

Resumen—El desarrollo de la optofarmacología permite el uso de moléculas fotoinducibles, de manera que cuando son iluminadas a una determinada luz de onda se fotoisomerizan cambiando de un estado inactivo a activo. Este mecanismo de acción controlado por la luz permite el uso como nuevas terapias para diferentes patologías, tales como la diabetes, el cáncer o el control del dolor. Además, superan las limitaciones de los fármacos convencionales, permitiendo el control espacio temporal del efecto del fármaco.

Palabras Claves— Fotofármacos, optofarmacología, luz, QAQ, JB253, fotoestatinas, JF-NP-26.

1. INTRODUCCIÓN

La optofarmacología es una disciplina emergente en la farmacología, basada en el control de la actividad de un fármaco mediante la luz. De este modo, mediante los fotofármacos, es posible desencadenar respuestas biológicas frente a la irradiación de luz a longitudes de onda concretas. Esto permite un control remoto de la actividad del fármaco tanto temporal como espacial, con una regulación altamente precisa de sus efectos *in vivo*. Esta nueva disciplina supone uno de los principales objetivos actuales en el descubrimiento de fármacos [1].

La luz es el estímulo externo ideal para controlar los procesos biológicos con alta precisión: se puede manipular con una alta precisión espacial y temporal, puede proyectarse sobre un tejido desde lejos y, dado a que las células por naturaleza no son fotosensibles intrínsecamente, la luz puede usarse como estímulo altamente específico [2].

Los medicamentos controlados por la luz se basan en moléculas fotoactivables que superan las limitaciones de la farmacología convencional, tales como distribución lenta e imprecisa del fármaco, falta de especificidad espacial o temporal en el organismo, dificultad en el ajuste de la dosis, etc. Además, permite el uso de proteínas sin modificar genéticamente [1].

En este sentido, son varias las moléculas desarrolladas capaces de ser controladas mediante la luz, perfilando un nuevo horizonte en el descubrimiento de nuevos analgésicos, anticancerígenos, fármacos relacionado con la degeneración macular relacionada con la edad, diabetes, etc. asimismo como de las vías de administración y el control de la acción farmacológica [3]. En este trabajo se describirán varias pequeñas moléculas fotoactivables como son las fotoestatinas (PSTs); la molécula JF-NP-26; la molécula fotoisomerizable amonio cuaternario amonio-azobenceno-amonio cuaternario (QAQ) y la molécula JB253, una sulfonilurea fotoinducible.

2. FÁRMACOS FOTOINDUCIBLES

2.1. QAQ, Amonio cuaternario amonio-azobenceno-amonio cuaternario

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una enfermedad que afecta la macula a través de una serie de cambios neurodegenerativos multifactoriales que llevan a una pérdida irreversible de la visión central. Se trata de la principal causa de ceguera en personas mayores de 50 años en países industrializados [4]. Los tratamientos actuales se basan en el diagnóstico precoz y el tratamiento previo al daño de la retina, pero esto no siempre es suficiente para evitar la enfermedad. Además, terapias prometedoras como los implantes electrónicos de retina, las terapias génicas y el trasplante de células madre suponen procedimientos muy invasivos. De este modo, los compuestos fotoactivables surgen como solución, permitiendo el fotocontrol bidireccional del potencial de membrana neuronal.

En concreto, la molécula amonio cuaternario amonio-azobenceno-amonio cuaternario (QAQ), está formada por un azobenceno, de manera que al ser iluminada con una longitud de onda de 380nm, pasa de su forma *trans*-QAQ a *cis*-QAQ en el orden de picosegundos (Figura 1). Mientras que la reversión de *cis* a *trans* es mucho más lenta, pudiendo darse a 500nm o en oscuridad [5].

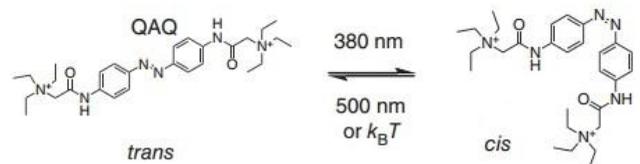


Fig. 1. Fotoisomerización a 380nm de la molécula *trans*-QAQ a *cis*-QAQ activa [6].

Cuando las neuronas en presencia de QAQ son iluminadas a 500nm. se bloquean los canales de voltaje de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ [6], de modo que cuando posteriormente son iluminadas a 380nm, estos canales se desbloquean permitiendo un disparo neuronal a alta frecuencia.

Esta fotoisomerización supone una terapia prometedora para la reestablecer la sensibilidad a la luz en la retina y, por tanto, las respuestas visuales [7], en enfermedades como la degeneración macular relacionada con la edad.

2.2. JB253, Sulfonilurea fotinducible

Las sulfonilureas fueron los primeros medicamentos orales disponibles para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) [8], siendo actualmente ampliamente prescritos. Estos fármacos estimulan la liberación de insulina de las células β -pancreáticas, actuando sobre los canales de potasio sensible a ATP (K_{ATP}), y tienen una serie de efectos extrapancreáticos, incluyendo la disminución de la depuración de la insulina hepática y la reducción de la secreción de glucagón. Una limitación de estos compuestos es el elevado riesgo de desarrollar hipoglucemia y enfermedades cardiovasculares, ambas complicaciones potencialmente fatales.

Mediante el uso de la molécula JB253, una sulfonilurea fotoinducible, se permite el control óptico de la liberación de insulina. Este fármaco está basado en la glimepirida, que lleva un azobenceno, y su síntesis es un procedimiento simple de tres etapas comenzando con la sulfanilamida. La sulfanilamida se somete a diazotación y se atrapa con N, N- dietilanilina para dar una azobenceno-sulfonamida, que se convierte en JB253 por isocianato de ciclohexilo. (Figura 2) [9].

Cuando esta molécula se ilumina con longitudes de onda cercanas a los 472nm, se fotoisomeriza pasando del estado *trans* a *cis*. Tras la fotoisomerización en el estado *cis*, JB253 se hace más activo, cerrando el canal K_{ATP} . La relajación térmica hace que el compuesto sea menos activo o conduzca a la disociación, restableciendo la forma abierta del canal. Al aplicarse sobre los islotes de Langerhans, el cierre de los canales de K_{ATP} , que conduce a la despolarización, se traducirá en un flujo de Ca^{+2} activado y finalmente en la liberación de insulina [9].

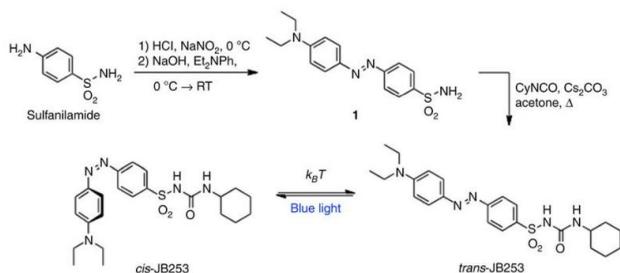


Fig. 2. Síntesis de la molécula JB253 y fotoisomerización bajo luz azul [9].

2.3. Fotoestatinas

Los microtúbulos son componentes altamente dinámicos del citoesqueleto que desempeñan papeles vitales en una variedad de procesos celulares, incluyendo el transporte intracelular, la motilidad celular y la proliferación celular. Es por ello que el control de la dinámica de los microtúbulos con fármacos como el Taxol y los alcaloides

de la vinca, es una terapia ampliamente utilizada en la investigación de la biología celular y como fármacos anticancerígenos en quimioterapia [10]. Sin embargo, estos fármacos no son específicos, por lo que su actividad no puede restringirse a células diana específicas, provocando efectos secundarios graves en la quimioterapia.

Con el desarrollo de la optofarmacología surgen las fotoestatinas (PSTs) como inhibidores de los microtúbulos pudiéndose activar y desactivar *in vivo* mediante la luz visible [11]. Su síntesis se da por acoplamiento de diazonio en dos a cuatro pasos (Figura 3).

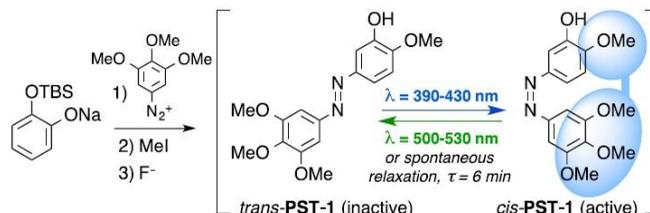


Fig. 3. Síntesis y fotoisomerización de la fotoestatina a 390-430nm [11].

Cuando las fotoestatinas son iluminadas con luz azul (390-430nm) se activan modulando la dinámica de los microtúbulos con una precisión espacial de una sola célula, y con un tiempo de repuesta *in vivo* inferior a un segundo. Se ha comprobado en cultivos celulares que las fotoestatinas expuestas a la luz azul muestran una citotoxicidad 250 veces superior que cuando se mantienen en oscuridad. Por lo tanto, las fotoestatinas pueden servir como valiosas herramientas para la biología celular, y son unas moléculas prometedoras como nueva clase de quimioterápicos de precisión cuya toxicidad puede ser limitada espacio-temporalmente usando la luz [11].

2.4. JF-NP-26

Los receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu) están ampliamente distribuidos a lo largo de la neuraxis del dolor, modulando la transmisión del dolor a diferentes niveles anatómicos [12]. En este sentido, los ligandos del receptor mGlu son considerados candidatos a fármacos para el tratamiento del dolor crónico y la migraña. Sin embargo, su uso sistémico puede estar limitado por los efectos adversos relacionados con el mecanismo, tales como la hepatotoxicidad y el deterioro cognitivo [13].

La molécula JF-NP-26 es un fármaco inactivo basado en los receptores mGlu5, que cuando es iluminada con una longitud de onda de 405 nm se activa, pudiendo dirigirse exclusivamente a las regiones cerebrales implicadas críticamente en el control del dolor (Figura 4).

La iluminación del fotofármaco induce en él una rotura que libera la molécula activa (raseglurant), la cual bloquea el receptor metabotrópico de glutamato tipo 5 (mGluR5), implicado en la transmisión neuronal del dolor, entre muchas otras funciones neuronales. El bloqueo de este receptor permite anular la transmisión del dolor desde la periferia del cuerpo al cerebro del organismo.

Este bloqueo lo podemos producir tanto en las neuronas periféricas como en el sistema nervioso central (cerebro) y generar, en ambos casos, un efecto analgésico como resultado final. Además, se ha comprobado que cuando se administra a un animal no tiene ningún efecto farmacológico hasta que el tejido diana es irradiado con luz del espectro visible, y no muestra efectos tóxicos ni indeseables en animales, incluso a dosis elevadas [13].

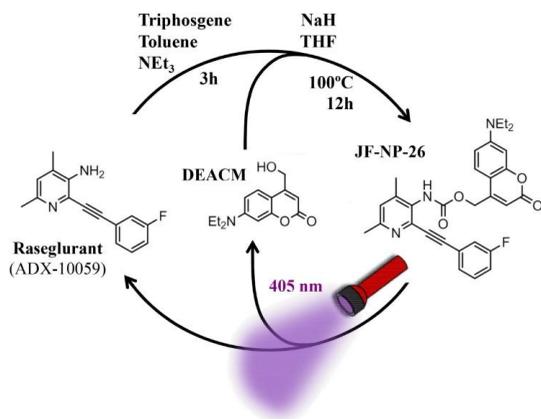


Fig. 2. Fotoisomerización a 405nm de la molécula JF-NP-26 [13].

3. CONCLUSIONES

La optofarmacología ha surgido como una disciplina de la farmacología que ha experimentado un rápido desarrollo en la última década. La administración sistémica de fármacos inactivos que son activados por la luz, puede proporcionar una estrategia potente para diferentes terapias tales como el control del dolor en migrañas, la diabetes, el cáncer, y la degeneración macular relacionada con la edad. Estos fármacos superan los inconvenientes de los fármacos convencionales, limitando la dosis y los efectos adversos, además poseen una alta especificidad espacio-temporal.

Uno de los inconvenientes actuales a superar en la optofarmacología es la limitada penetración de luz en los tejidos profundos. Actualmente se están desarrollando moléculas fotoactivables que se activan a longitudes de ondas más largas, permitiendo la penetración en los tejidos.

Aunque en este trabajo sólo se hayan desarrollado cuatro moléculas, son muchas las que se encuentran en estudio planteando un futuro prometedor para la farmacología y como nuevas terapias para las cuales existen fármacos ampliamente utilizados.

REFERENCIAS

[1] Lerch, Michael M., et al. Emerging targets in photopharmacology. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, vol. 55, no 37, p. 10978-10999.

[2] Mourrot, Alexandre; Tochitsky, Ivan; Kramer, Richard H. Light at the end of the channel: optical manipulation of intrinsic neuronal excitabil-

ity with chemical photoswitches. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2013, vol. 6, p. 5.

[3] Groynom, Rebecca, et al. Controlled release of photoswitch drugs by degradable polymer microspheres. *Journal of drug targeting*, 2015, vol. 23, no 7-8, p. 710-715.

[4] Mehta, Sonia. Age-related macular degeneration. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 2015, vol. 42, no 3, p. 377-391.

[5] Van Gelder, Russell N. Photochemical approaches to vision restoration. *Vision research*, 2015, vol. 111, p. 134-141.

[6] Mourrot, Alexandre, et al. Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nature methods*, 2012, vol. 9, no 4, p. 396-402.

[7] Polosukhina, Aleksandra, et al. Photochemical restoration of visual responses in blind mice. *Neuron*, 2012, vol. 75, no 2, p. 271-282.

[8] Thulé, Peter M.; UMPIERREZ, Guillermo. Sulfonylureas: a new look at old therapy. *Current diabetes reports*, 2014, vol. 14, no 4, p. 1-8.

[9] Broichhagen, Johannes, et al. Optical control of insulin release using a photoswitchable sulfonylurea. *Nature communications*, 2014, vol. 5.

[10] Mukhtar, Eiman; Adhami, Vaqar Mustafa; Mukhtar, Hasan. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics*, 2014, vol. 13, no 2, p. 275-284.

[11] Borowiak, Malgorzata, et al. Photoswitchable inhibitors of microtubule dynamics optically control mitosis and cell death. *Cell*, 2015, vol. 162, no 2, p. 403-411.

[12] Kolber, Benedict J. Chapter Ten-mGluRs Head to Toe in Pain. *Progress in molecular biology and translational science*, 2015, vol. 131, p. 281-324.

[13] Font, Joan, et al. Optical control of pain in vivo with a photoactive mGlu5 receptor negative allosteric modulator. *eLife*, 2017, vol. 6, p. e23545.



Alicia Ortega Rodríguez recibió el título de graduada en Bioquímica con mención en Biotecnología por la Universidad de Málaga en 2016. Actualmente está realizando el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria con especialidad en Terapia Celular en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Taltz (Ixekizumab): nuevo fármaco frente la psoriasis

Noelia Arroyo de Alba

Resumen—La psoriasis es una enfermedad inmunológica de la piel caracterizada por una inflamación crónica y una proliferación de los queratinocitos junto a la acumulación de células inmunes, principalmente células Th17. El estudio de fármacos cuya diana principal fueran las células Th17 o sus productos de secreción, ha permitido que recientemente en España se comercialice el fármaco Ixekizumab con el nombre comercial Taltz, el cual supera las tasas de recuperación de pacientes con psoriasis frente a fármacos similares anteriormente usados como tratamiento.

Palabras Claves— IL-17, Ixekizumab, Psoriasis, Taltz, Tratamiento.



1. INTRODUCCIÓN

La psoriasis es un trastorno inflamatorio crónico y recurrente de la piel que afecta al 2-3% de la población [1]. Principalmente causa descamación e inflamación, con un evidente perjuicio sobre la calidad de vida del enfermo, que requiere un tratamiento prolongado lo que trae aparejado un alto impacto psicológico, social y económico.

Se produce como consecuencia de la combinación de factores genéticos, mecanismos inmunológicos y factores medioambientales desencadenantes. [2]

Por norma general, las células de la piel crecen desde las capas más profundas y suben lentamente a la superficie, reemplazando constantemente a las células muertas. Este proceso se llama renovación celular, y tarda aproximadamente un mes. Con la psoriasis, la renovación celular ocurre en sólo unos pocos días, lo que provoca que las células nuevas suban demasiado rápido y se acumulen en la superficie. [2]

Puede manifestarse como varios fenotipos, incluyendo psoriasis en placas (constituye la forma más frecuente y se caracteriza por placas rojas bien delimitadas, las cuales se suelen localizar en las rodillas, codos y la zona sacra), psoriasis en las palmas y las plantas, psoriasis en el cuero cabelludo, psoriasis en las uñas (aparecen como engrosamiento y deformación de las uñas, acompañado a veces de manchas amarillas que corresponden al despegamiento de la uña a su lecho), psoriasis en la cara, psoriasis en los pliegues (también llamada «psoriasis invertida», la cual puede afectar a cualquier pliegue cutáneo como axilas, ingles...), psoriasis en gotas (recibe este nombre porque las lesiones son pequeñas, numerosas y distribuidas de forma irregular por todo el cuerpo), psoriasis eritrodérmica (recibe esta denominación cuando las lesiones afectan casi toda la superficie cutánea), psoriasis pustulosa (aparecen pústulas sobre las placas). Es importante mencionar que cualquiera de estos fenotipos pueden ocurrir en un mismo individuo. [2]

Los síntomas que comparten todos los fenotipos pueden incluir picazón, ardor y dolor. El grado de afectación de la piel es variable. La mayoría de los tipos de psoriasis

tienen una evolución cíclica, con brotes que pueden llegar a durar semanas o meses y posteriormente disminuyendo, entrando incluso en un período de remisión. [2]

2. DESCRIPCIÓN CLÍNICA

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica relativamente común, que se caracteriza por una hiperproliferación de los queratinocitos, secundaria a la activación del sistema inmune, el cual produce una mayor liberación de citoquinas pro-inflamatorias que causan daño a largo plazo en múltiples tejidos y órganos. [3]

De acuerdo con la severidad de las manifestaciones cutáneas, la psoriasis se clasifica en débil, moderada y severa. Para clasificarla se emplea comúnmente el índice de severidad PASI, del inglés *psoriasis area and severity index*, que se basa en el grado de eritema, infiltración, presencia de escamas y extensión de la afectación en las cuatro áreas corporales (cabeza, tronco, miembros superiores y miembros inferiores). [4]

Nuestra comprensión de la fisiopatología de la psoriasis ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, en paralelo con el desarrollo de nuevos fármacos para tratarla. Hoy en día se conocen con mayor claridad las anomalías inmunológicas observadas en los pacientes con psoriasis, identificándose las células T Th17 como las principales implicadas en la desregulación inmune psoriásica. El exceso de actividad de las células Th17 conduce a defectos en la presentación de antígenos, la función celular inmune innata y adaptativa, y la producción desequilibrada de citoquinas, que contribuyen a la inflamación patológica observada en la psoriasis. [5]

Las células Th17 son una clase de célula T CD4+ efectoras que maduran en respuesta a la interleucina 23 (IL-23) producida por las células dendríticas de la piel. Son las células primarias responsables de la defensa inmune contra patógenos extracelulares en la piel y membranas mucosas, con la capacidad de producir grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias como IL-17 A, IL-22 y factor de necrosis tumoral alpha (TNF α), entre otras. Colectivamente, todas estas citoquinas producidas por las células Th17 tienen efectos sobre la diferenciación celular, el reclutamiento y la activación de células inmunes, así como la liberación de péptidos antimicrobianos. Tanto el

exceso de actividad, como la pérdida de ella, están asociadas con enfermedades de la piel. [5]

En concreto, la citoquina IL-17 A producida por las células Th17 es clave para el desarrollo de la psoriasis (Fig. 1). Sus niveles elevados promueven la hiperproliferación de queratinocitos y estimulan la producción de otras citoquinas proinflamatorias [6]. Al mismo tiempo, los neutrófilos y los macrófagos son reclutados en las placas psoriásicas, produciendo IL-17 A y TNF α , respectivamente [7]. Del mismo modo, se produce un reclutamiento de células sanguíneas.

Desde el punto de vista histológico, la psoriasis se caracteriza por la presencia de hiperplasia en la epidermis, debido a la acumulación de células inflamatorias particularmente neutrófilos y linfocitos T, así como dilatación y proliferación de vasos sanguíneos en la dermis. Este aumento de la vascularización de la dermis se debe a factores angiogénicos, como el factor de crecimiento del endotelio vascular, cuyos niveles se encuentran elevados en las placas psoriásicas. [2]

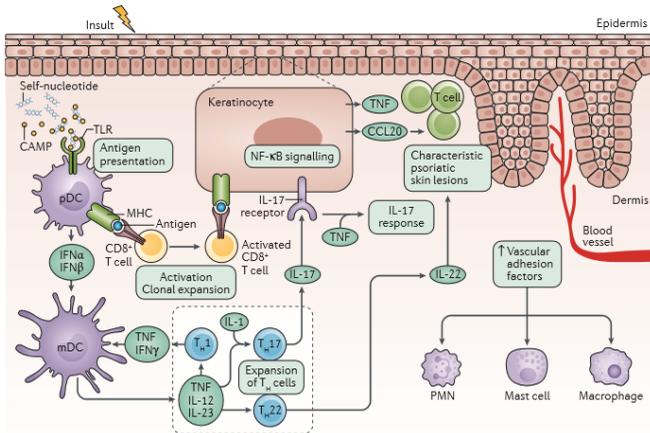


Fig.1. Mecanismo molecular de la psoriasis. Factores externos como trauma, infección o medicación pueden causar la liberación de auto-nucleótidos, especialmente en individuos genéticamente predispuestos, los cuales pueden unirse a receptores de células presentadoras de antígeno. Esta unión desencadena la expansión clonal de células T CD8+ específicas de antígeno. Posteriormente, las células T CD8+ activadas migran a la epidermis y activan la liberación local de factores solubles, incluyendo citoquinas y mediadores de la inmunidad innata, factores que aumentan la inflamación local y estimulan la proliferación de queratinocitos. Además, estos mediadores de inmunidad innata estimulan las actividades de poblaciones de células T que liberan citoquinas y quimiocinas adicionales. En particular, la respuesta de células TH17 a IL-23 es potenciada por IL-1. La IL-17 actúa sobre queratinocitos estimulando la producción de defensinas y quimiocinas, lo que promueve la defensa del huésped y conduce al reclutamiento de células inflamatorias adicionales en la lesión. La IL-22 contribuye al característico fenotipo histológico psoriásico. Los factores claves de transcripción en la psoriasis incluyen AMP cíclico, transductor de señal de la quinasa Janus (JAK), activador de la familia de la transcripción (STAT) y factor nuclear κ B (NF- κ B); Su activación conduce a una producción adicional de factores,

tales como TNF e IL-17. Ilustración de Jacqueline E.Greb *et al.* (2016).

3. ETIOLOGÍA

La psoriasis posee etiologías tanto genéticas como ambientales. Aproximadamente el 35-65% de gemelos idénticos fraternales, poseen concordancia con la psoriasis. Un análisis de agrupamiento de oligonucleótidos identificó 1.338 genes con papeles potenciales en la psoriasis. Estos genes incluían los que codificaban células T y proteínas de células dendríticas, así como citoquinas [8]. Estos genes se denominan genes de susceptibilidad PSORS, de los cuales el más importante es el PSORS1, ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, que coincide con la región del sistema de histocompatibilidad. Entre ellos, el de más fuerte asociación parece ser el gen del antígeno HLA-C y fundamentalmente su alelo HLA-C*06:02. Este alelo está presente en el 60% de los enfermos de psoriasis, en comparación con el 15% en la población general, y los individuos que lo expresan tienen un riesgo 10-20 veces mayor de desarrollar psoriasis que los que no lo poseen. [9]

La fuerte asociación de la psoriasis con el alelo HLA-C*06:02 apoya el criterio de la psoriasis como un desorden inmune. Además de la predisposición genética, una amplia gama de agentes ambientales pueden causar brotes de psoriasis. Estos incluyen traumatismos (conocido como fenómeno de Koebner) infección por VIH, infecciones estreptocócicas, así como diversos medicamentos que contengan interferones (IFNs α y β), entre otros [10].

4. TRATAMIENTO

Recientemente, en el año 2016, ha sido aprobado por Agencia Europea de Medicamentos (EMA) un nuevo fármaco contra la psoriasis llamado Ixekizumab, con nombre comercial Talz, que posee una mayor eficacia frente a fármacos previamente disponibles en el mercado como Secukinumab (Fig. 2). [7]

Ixekizumab es un nuevo anticuerpo monoclonal, comercializado recientemente en España, de tipo IgG4 que se une con una afinidad alta y de forma específica a la IL-17 A (Fig. 3), indicado para el tratamiento de la psoriasis en placas de moderada a grave. [11]

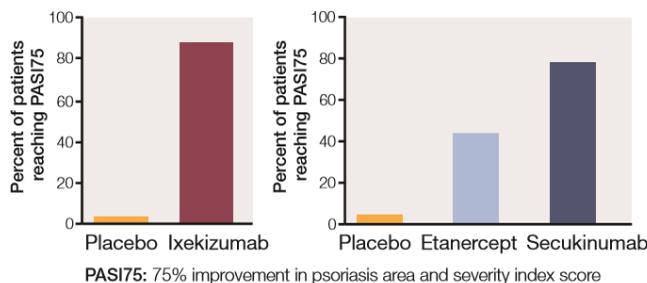


Fig.2. Resultados de diversos ensayos clínicos en los cuales se observa una mayor eficacia de Ixekizumab frente a otros fármacos usados en psoriasis como Etanercept y Secukinumab. Ilustración de Patrick R. Burkett *et al.* (2016).

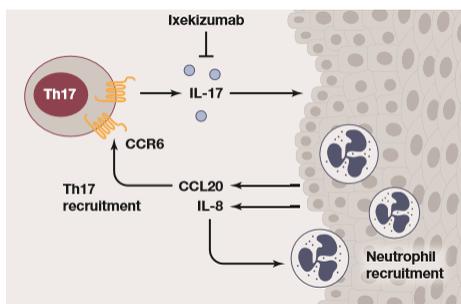


Fig.3. Ilustración del mecanismo de acción del fármaco Ixekizumab, el cual se une a la IL-17 neutralizando su acción. Ilustración de Patrick R. Burkett *et al.* (2016).

Al neutralizar la acción de IL-17 (Fig. 3), Ixekizumab reduce la inflamación y produce un aclaramiento de las lesiones cutáneas. Además, comparado con los demás antagonistas de IL-17 A, posee las mejores tasas de recuperación de las placas psoriásicas (Fig. 2). [7]

Este medicamento se administra mediante inyección subcutánea, tratando de evitar en la medida de lo posible, lugares o zonas de la piel que muestren signos de psoriasis. La pauta de dosificación aprobada para Ixekizumab es una dosis de carga de 160 mg en inyección subcutánea (dos inyecciones de 80 mg) en la semana 0, seguida de una inyección de 80 mg cada dos semanas durante 12 semanas. Después de estas 12 semanas de inducción, pasa a administrarse cada cuatro semanas en pauta de mantenimiento. [2]

En los ensayos clínicos, Ixekizumab demostró unas altas tasas de eficacia con independencia de la edad, sexo, raza y peso corporal.

Los resultados de los ensayos clínicos, en los cuales el índice PASI es usado como índice de eficacia, han demostrado rapidez de acción con efectos apreciables a la semana, y altos índices de blaqueamiento de la piel a las 12 semanas. Aproximadamente 9 de cada 10 pacientes lograban un PASI del 75% (correspondiente a una tasa de recuperación del 75% respecto a su índice PASI inicial), aproximadamente 7 de cada 10 lograban una respuesta PASI del 90%, y casi 4 de cada 10 alcanzaban una respuesta PASI del 100% [11] (resolución completa de las lesiones).

Esta mayor eficacia frente a otros fármacos como Etanercept y Secukinumab, ha provocado que la EMA haya aprobado Ixekizumab como tratamiento de primera línea en pacientes a partir de 18 años que sufran psoriasis moderada y/o grave. [6]

El perfil de seguridad se consideró adecuado, sin indicios de un aumento de las infecciones graves ni de las neoplasias. De forma similar a otros medicamentos biológicos, los efectos secundarios más frecuentes son: reacciones en el lugar de la inyección, un leve aumento de las infecciones de las vías respiratorias superiores, dolor de cabeza...principalmente durante el primer año de tratamiento. Igual que sucede con otros medicamentos biológicos no puede administrarse en pacientes con antecedentes de cáncer e infecciones graves. Al igual que con Secukinumab, con quien comparte un mecanismo de ac-

ción muy similar, se ha visto que puede aumentar ligeramente la frecuencia de infecciones fúngicas por *Candida albicans*; esto se debe a que la IL-17 es necesaria para la inmunidad frente a dicho hongo. Por lo tanto, no es sorprendente que las tasas de candidiasis oral y genital encontradas en pacientes tratados con Ixekizumab fueran mayores a los pacientes tratados con placebo. [7]

Actualmente se encuentran también en investigación varios agentes que se dirigen a la vía IL-17. Un enfoque novedoso es la aplicación de nanoanticuerpos anti IL-17 en el tratamiento de la psoriasis. Los miméticos de anticuerpos son pequeñas proteínas de unión a las moléculas diana con la misma afinidad y especificidad que los anticuerpos. La fusión genética de estas moléculas a anticuerpos permite la producción de un anticuerpo bi-específico completamente humano anti-TNF y anti-IL-17 A. [12]

5. CONCLUSIONES

Gracias a la incesante investigación llevada a cabo con el fin de encontrar un remedio definitivo frente a enfermedades de tipo inmunológico, y en concreto en este artículo frente a la psoriasis, hoy en día nos encontramos más cerca del logro de un fármaco realmente efectivo. Aunque en el caso del fármaco Taltz únicamente un 40% de pacientes logran tasas de recuperación del 100%, nuevos estudios farmacológicos podrían optimizar el diseño de dicho fármaco con el fin de buscar tasas de recuperación mayores a las actualmente logradas.

REFERENCIAS

- [1] Momose, M and A. Asahina. "Biologic treatments for elderly patients with psoriasis", *Dermatology*, pp.1-14, Aug 2016, doi: 10.1111/1346-8138.13853
- [2] Web de la Asociación Acción Psoriasis. <http://www.accionpsoriasis.org/>
- [3] J.Greb and A.Goldminz. "Psoriasis". *Nature Reviews*, vol.2, Nov 2016, doi:10.1038/nrdp.2016.82
- [4] E. Puzenat and V. Bronsard. "What are the best outcome measures for assessing plaque psoriasis severity? A systematic review of the literatura", *Journal European Academy of Dermatology and Venereology*, vol.24, pp. 10-16, Dec 2009, doi: 10.1111/j.1468-3083.2009.03562.
- [5] J. Zeichner and A. Armstrong. "The Role of IL-17 in the Pathogenesis and Treatment of Psoriasis", *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, vol.9, pp. 6-9, Jun 2016
- [6] A. Beringer and M. Noack. "IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting", *Trends in Molecular Medicine*, pp. 1-12, 2016, doi: 10.1016/j.molmed.2016.01.001
- [7] M. Lowes and C. Russell. "The IL-23/T17 pathogenic axis in psoriasis is amplified by keratinocyte responses", *Trends Immunol* vol. 34, pp. 174-181, Apr 2013, doi: 10.1016/j.it.2012.11.005.
- [8] Alice B. Gottlieb. "Psoriasis: Emerging therapeutic strategies", *Nature Reviews*, vol.4, Jan 2005, doi: 10.1038/nrd1607
- [9] R. Nair and P. Stuart. "Sequence and Haplotype Analysis Supports HLA-C as the Psoriasis Susceptibility 1 Gene", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 78, pp. 827-851, May 2006

- [10] L. Fry and B. Baker. "Triggerin psoriasis: the role of infections and medications", *Clinics in Dermatology*, pp. 606-615, 2007, doi: 10.1016/j.clindermatol.2007.08.015
- [11] Y. Syed. "Ixekizumab: a review in moderate to severe plaque psoriasis", *Am J Clin Dermatol*, vol. 18, pp. 147-158, 2017, doi: 10.1007/s40257-017-0254-4
- [12] A. Wasilewska and M. Winiarska. "Interleukin-17 inhibitors. A new era in treatment of psoriasis and other skin diseases", *Advances in Dermatology and Allergology*, pp. 247-252, Aug 2016, doi: 10.5114/ada.2016.61599



Noelia Arroyo de Alba recibió el título de Graduada en Biología por la Universidad de Córdoba en 2016. Actualmente se encuentra cursando un Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide, con el cual pretende ampliar sus conocimientos centrados en la rama biosanitaria del campo de la biología.

Metodologías de desarrollo en videojuegos

Manuel Ridao Pineda

Resumen— En este artículo se explica de manera generalizada cómo se aborda el desarrollo de un videojuego desde un punto de vista del desarrollo software, y en qué se diferencia este de el desarrollo software tradicional y otros medios audiovisuales.

Palabras Claves— Desarrollo, Videojuegos, Software, Audiovisual, Metodología, Diseño, Roles, Fases.

1. INTRODUCCIÓN

Es fácil pensar en que la producción de un videojuego es similar a la de un producto de entretenimiento audiovisual, como una película o una serie de animación. Sin embargo, esta comparación no podría estar más lejos de la realidad, ya que el componente que diferencia a un videojuego de otros medios audiovisuales es la interacción con el consumidor, y esta se consigue mediante software.



Figura 1. Desarrollo de un videojuego

No obstante, sí que es cierto que el desarrollo de un videojuego es un procedimiento multidisciplinar, y sufre una fuerte influencia por parte de los componentes audiovisuales. Por lo tanto, es necesario tenerlos muy en cuenta en el proceso de desarrollo.

2. FASES EN EL DESARROLLO DEL SOFTWARE EN UN VIDEOJUEGO

Existen tres fases en el desarrollo del software para un videojuego tradicional[1]

2.1. Pre-producción

La etapa de preproducción en el desarrollo de un videojuego equivale, en rasgos generales, a las etapas de toma de requisitos y análisis en el desarrollo del software tradicional. En el desarrollo de videojuegos triple-A[2], el cliente y el usuario final no son la misma persona: generalmente, el cliente es la empresa distribuidora[3] que financia y comercializa el proyecto, y va a tener una fuerte influencia durante todo el proceso creativo, mientras que los usuarios finales ejercerán una mayor o menor influencia (esta

varía caso por caso) en las etapas finales del proyecto.

En esta etapa de preproducción, los diseñadores preparan un documento de diseño de videojuego (GDD, por sus siglas en inglés: *game design document*), donde queda reflejado todo lo relacionado con el concepto del videojuego, desde su visión artística, *gameplay* y modelo de negocio. A diferencia de los documentos usados en desarrollo software tradicional, como, por ejemplo, los casos de uso o el modelo de dominio, el GDD es un documento vivo, que cambia a medida que se avanza en el desarrollo, y se da por finalizado junto con este.

2.2. Producción

En la etapa de producción, todos los equipos involucrados en el proyecto trabajan para desarrollar el videojuego. Aunque normalmente cada equipo trabaja de manera independiente y van entregando los *assets*[4] a medida que los van finalizando, es necesario un elevado grado de comunicación y coordinación, que es aportada por los colaboradores de la distribuidora y los diseñadores de *gameplay*.

2.3. Post-producción

Una vez finalizado el desarrollo principal del videojuego, es necesario completarlo con una detallada etapa de refinamiento, donde, principalmente, se buscan y solucionan todos los bugs y desequilibrios que presente el juego. Además, se intensifica la promoción del producto y se preparan los contenidos extra en caso de que los haya.

3. METODOLOGÍAS

El desarrollo de videojuegos es un campo menos maduro que el desarrollo de software tradicional, por ello, no existe una metodología estándar que se emplee en todos los casos. Generalmente, se emplean combinaciones de metodologías de desarrollo tradicionales, que cada compañía ha evolucionado y adaptado a sus necesidades[5].

3.1. Metodología en cascada

Es prácticamente imposible saber si un concepto de juego será o no entretenido sin haberlo probado antes. Por ello, en general, el modelo en cascada es desaconsejable en el desarrollo de videojuegos. Esto se debe a la naturaleza experimental del procedimiento: los diseñadores de *gameplay* deben experimentar con el producto para encontrar

trar un punto en el que este sea innovativo y entretenido. No tiene sentido seguir desarrollando un concepto de juego que ha resultado no llegar a los niveles de entretenimiento que se esperaban. Por ello, es necesario contar con una versión jugable del producto lo antes posible para poder probarlo, algo que el método en cascada no favorece.

No obstante, sí que es posible aplicar el método en cascada en situaciones en las que se está trabajando con una fórmula ya probada, como en una secuela a un título ya existente, o bajo un contrato que estipula fechas límites y presupuestos rígidos[6].

3.1. Metodologías ágiles

Según Bates[5], las metodologías ágiles son más útiles en proyectos donde los requisitos no están entendidos del todo desde el principio, nuevas tecnologías deben ser creadas, y el cliente quiere estar involucrado estrechamente en el proceso de desarrollo. Estos casos describen perfectamente al proceso de creación de un videojuego partiendo desde cero. La idea principal de las metodologías ágiles aplicadas a videojuegos es crear un prototipo lo más rápido posible, que permita probar el juego lo antes posible, refinando lo que gusta y desechando lo que no, mediante una organización del trabajo en iteraciones. En la Figura 2[7] puede verse un ejemplo de un prototipo para el videojuego *Starcraft*[8], creado con los *assets* y el motor gráfico del anterior juego de la compañía, *Warcraft II*[9].



Figura 2: Prototipo de Starcraft

Basándose en el prototipo que haya creado al inicio de cada iteración de trabajo, se añaden funcionalidades y *assets* de manera acumulativa, hasta que se haya completado el proyecto. De este modo, el equipo diseñador y productor se involucran de manera más cercana en el proceso, y toman decisiones junto con el equipo desarrollador.

Cada prototipo debe tener un ciclo de desarrollo, con requisitos funcionales, un plan para implementarlos, y una

fecha límite. Además, es conveniente que el equipo desarrollador planee reuniones para facilitar y agilizar la coordinación, y controlar los desafíos que vayan surgiendo.

5. CONCLUSIONES

Un videojuego es un proyecto de software complejo y multidisciplinar, y hay videojuegos desarrollados por equipos de todos los tamaños, desde una sola persona a varias centenas. Además, es un área de trabajo relativamente moderna, volátil y en constante cambio, y muy dependiente de la tecnología hardware del momento. Por lo tanto, es prácticamente imposible elegir un método de desarrollo tradicional que se adapte apropiadamente a todas las situaciones. Aun así, a la hora de comenzar a desarrollar un videojuego, es imprescindible contar con cierto grado de planificación, ya que, ante todo, la creación de videojuegos es un negocio, que no puede sobrevivir si no se cumplen las fechas límites y los presupuestos establecidos.

REFERENCIAS

- [1] R. Edwards, "The Game Production Pipeline: Concept to Completion", *IGN*, <http://www.ign.com/articles/2006/03/16/the-game-production-pipeline-concept-to-completion?page=1>. 2006.
- [2] Definición de Triple A, *GamerDic, Diccionario online de términos sobre videojuegos y cultura gamer*, <http://www.gamerdic.es/termino/triple-a>. 2013.
- [3] Más información en: Wikipedia, "Distribuidora de Videojuegos", *Wikipedia* https://es.wikipedia.org/wiki/Distribuidora_de_videojuegos. 2016.
- [4] Más información en: Wikipedia, "Assets de videojugos", *Wikipedia*, https://es.wikipedia.org/wiki/Motor_de_videojuego#Assets. 2017.
- [5] B. Bates, *Game Design*. Boston, Massachusetts: Thompson Course Technology, pp. 203-234, 2004.
- [6] E. Preisz, "Waterfall Game Development Done Right", *Gamasutra*, http://www.gamasutra.com/view/feature/181992/waterfall_game_development_done_.php. 2012.
- [7] U64 Staff & Contributors, "Starcraft [PC-Prototype / Beta]", *Unseen64*, <https://www.unseen64.net/2008/04/07/starcraft-pc-prototype-beta/>. 2008.
- [8] Web oficial de *Starcraft* de *Blizzard*. <http://us.blizzard.com/en-us/games/sc/>
- [9] Web oficial de *Warcraft II* de *Blizzard*. <http://us.blizzard.com/en-us/games/legacy/>



Manuel Ridao Pineda recibió el título de Grado en Estudios Ingleses por la Universidad de Sevilla en el año 2014, y el título de Máster Propio en Videojuegos: Guion, Diseño y Programación por la Universidad de Sevilla en 2015. Actualmente, se encuentra cursando tercer curso en el título de Grado en Ingeniería Informática en Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide. Aficionado a los videojuegos desde la infancia, y en constante proceso de aprendizaje en su desarrollo.

The Development Process of a Video game

Víctor Martinelli Rodríguez

Summary—The development process of a game is a very difficult and troublesome process that requires several teams of people to complete. Each team is assigned a specific task inside the development of the game such as programming or testing the game in search for bugs. However, even before a single line of code is written, many things are decided regarding the development of the game and even after it's release to the public, the game studio still must work on the game. In this article, we will be explaining everything that goes into the development process of a video game.

Keywords— Video game, Development, Roles, QA.

1. INTRODUCTION

In the last two decades, videogames have gotten a lot more complex with their design and conception. For example, during the 70s when the Atari 2600 was first released, the games at that time were simple because the cartridges for the console only had **4KB of memory** in them and the system had **128 bytes of RAM** [1]. These kinds of limitations made developers come up with simple graphics, simple sound effects and clever techniques to optimize the small space that the cartridges and the console had. It is also worth noting that it was very common during those days for the whole game to be made by a single person and not a team of developers. Nowadays, AAA games or even an indie game requires a graphics artist, a sound engineer, several programmers and more. This is due to two facts, first people demand more realistic looking games and secondly, the fact that computers are getting more and more powerful every year, thus making more advanced games possible. This forced developers to create entire teams of people dedicated to make a single part of the game such as level design or even beta testers. It also meant that developers had to spend a lot more money and time to develop their product. For instance, the development cost for Destiny, a 2014 game made by Activision, was **\$140 million** [2], while the development cost for E.T. the Extra-Terrestrial, an Atari 2600 game made in 1982 by Atari, was **\$22 million**. [3]

2. PRE-PRODUCTION

2.1. Game Pitch

Here is where the basic concept of the game is decided. The plot of the game doesn't need to be complicated to be good. Take for example Pac-Man, a game where you collect pellets to advance to the next level while avoiding ghosts. This doesn't mean that games with an elaborated plot are not popular either. An example of this is Heavy Rain, a story-driven game narrated from 4 different characters' perspectives in which they must solve the case of The Origami Killer. The game pitch doesn't need to be long either, just "the big picture" as it were of the game.

After the basic idea of the game has been decided (or approved in the case of a video game company), the game's development moves on to the next phase.

2.2. Game Design

This consists of describing the game in more detail such as the game's genre, setting, story and gameplay mechanics. Some instances also include concept art, which is a piece of illustration used to give an idea of how something is going to look in the finished product. It's also very important to have all the aspects of the game well thought out before moving into the production stage. Otherwise, you would be wasting company resources by having entire teams of people not being able to do anything because your game still has flaws in it's basic design. Even though it's important to have a well-designed game, it is also frequent that developers shift ideas during development of the game due to things like system limitations or having redundant mechanics in the game.

2.3. Prototypes

In this phase, they are used to represent the most important mechanics in the game, test new ideas that may come up during pre-production and mostly to **make sure that the core gameplay of the game is appealing to consumers**. These prototypes are often made very quickly and with little testing time, so they are almost certain to include bugs.

3. PRODUCTION

3.1. Graphics

Many developers focus most of their resources into this category, but the truth is that **having a good-looking game doesn't mean that the game is also good!** It adds more to the game, but it certainly doesn't make it instantly good. One prime example of this is Minecraft, a game that has simple graphics but with infinite gameplay possibilities since you can basically build anything you want. There are many graphic styles available, and they range from 2D, 3D and even an Isometric View. But what they all have in common is that they all start with rough sketches or concept art as an inspiration for later stages where they are given life through models or sprites.

3.2. Level Design

One important thing to take note of is that **if the levels are not fun, it is almost certain that the game will not be successful**. The levels of a videogame must keep the player entertained with a challenge without being overly difficult, and they don't need to be too long either or they will bore the player. It is also worth noting that each level of the game must be unique and fun for the player, and not a simple rehash of a previous one. It is also recommended to have a tutorial level at the start to teach the players the mechanics of the game and get them used to the game's controls.

3.3. Music and Sound Effects

The game's music needs to be representative of the tone, genre and the current event inside the game because otherwise, the player will not feel immersed into the gameplay and could possibly remember the game for its bad choice of music. A common technique used in some games is to first make the level and then make the music around the level depending on how the level plays. It is very common nowadays to have this part of the development of the game be outsourced to some professional music studios or use royalty free music if it's not a big developer with a big budget.

Another important part of a game's audio is its sound effects. Sound effects aren't as important as other aspects of a game, but they need to be believable of what the game is trying to represent. For instance, in a shooter, the sound effects for the guns must be realistic enough so that the player is immersed in the gameplay of the game, where in a platformer, the sound effect for jumping can be chosen more freely.

3.4. Programming

This is one of the most important things of any video game because if the game has a lot of bugs in it, the game will fail for sure. Normally made up of several people, the programmers of a game have the task of implementing the features demanded by the other teams of the project into the game. The programmers normally have the short end of the stick since they must figure out how to implement what they are told to. For instance, the game director may explain what feature they want for the programming team to implement such as, "I want the player to be able to hold up to 4 items in their inventory," but the programmer must interpret what the rest of the team wants and transform that into code. For example, "to solve this what I need is an array of 4 elements where every position represents an element that a player can hold." One important note about programming is to **never rush the coding of a video game** as this will cause the game to be very buggy and barely playable in the end.

3.5. Debugging and Testing

Debugging and coding the videogame are the two most important aspects of any videogame. In this stage of production, the game's development team plays the product while trying to find glitches or flaws in its gameplay. Normally for this task the company has a team of beta testers, a group of people that play the game to find any bugs or things that they didn't enjoy within the game. When the testers find something that they didn't enjoy or a bug, it is reported back to the designers of the game so that they can analyze it and try to solve it. One common technique used during this phase is to "try to break the game," which consists of playing the game to see if there are any hidden flaws. For example, what would happen if a player is killed by an enemy and reaches the goal of the level at the same time? Or what if the player is killed by two enemies at the same time? These are some of the ways a beta tester should try to test the game. It is also important to note that **no company should cut games resources that are directed towards the debugging of the game**, as this can cause the final product to be very buggy and ultimately fail. One prime example of this is one of the games mentioned in the introducing segment of this article, E.T. the Extra-Terrestrial. This Atari 2600 game is praised as possibly the worst videogame of all time due to the fact that the game was made in only 5 weeks [3] time by a single person, so he didn't have enough time to test game and was forced to keep the gameplay to a bare minimum. Therefore, it isn't surprising that the game was a huge failure due to the fact that, aside from other problems, it had a massive bug in which the player was stuck in a hole that he couldn't escape from without having to reset the console and start from the beginning again.



Fig. 1. Famous bug in E.T. the Extra-Terrestrial in which the player is stuck indefinitely inside a hole.

4. POST-PRODUCTION

4.1. Updates & Patches

This is a phase that was only available a decade ago since previous games didn't have any maintenance because it would have been very difficult to fix a bug in a physical copy of a game without the use of the Internet. However, some developers have done this with some releases in certain regions. For example, the American version of Pokémon Red had a bug in a certain city of the game that allowed the player to obtain Pokémon that could only be available through trading or even obtain glitch Pokémon [4]. This bug was fixed however, in some later European releases of the game [5].



Fig. 2. An example of the Pokémon that the player can encounter using the Old Man glitch in Pokémon Red.

Another way developers fixed bugs in their games was by patching later copies of the game.

Nowadays with the use of the internet, developers can now release a patch for it's game that any player that has a copy of the game can download an apply. Many times these patches are for fixing some bugs inside the game or even sometimes include new features that the players suggested. However, many developers have misused this feature by shipping incomplete games that they have claimed to fix later with a patch [6]. This was done in order to finish the game faster and then earn quick money with an unpolished game that they would supposedly fix once the consumer had bought the product. One of the most common ways that developers have successfully worked on a game during post-production is once they have collected enough player reports about bugs in the game, they start working on fixing them by releasing a patch that fixes as many bugs as possible.

5. CONCLUSIONS

The development of a game can be a very lengthy and costly process. It requires many hours of work, many people, plenty of time and a large amount of resources just to make a reasonable final product, so developers should be ready to assume the high cost of making a game. Sometimes it has even been the cause of the bankruptcy of a game studio. Such is the case of 3D Realms and the game Duke Nukem Forever. While the game was still in "development hell" for 12 years after being originally announced in 1997, the game developer 3D Realms had closed due to a lack of funds caused by the game's development cost [7]. A year later, the game development shifted to Gearbox Software and the game was finally released after 15 years in development in 2011 only to be received with negative reviews. From what we have learned, no project should be rushed to meet a release date or skimped on with very few resources like E.T the Extra-Terrestrial or spend 15 years in development hell like Duke Nukem Forever. The development of a game should take long enough to make a quality product that the player will enjoy playing.

REFERENCES

- [1] Atari 2600 Hardware Specifications: <http://problemkaputt.de/2k6specs.htm>
- [2] Bungie-Activision contract about Destiny: <http://documents.latimes.com/bungie-activision-contract/>
- [3] Interview with Howard Scott Washew, the man who single-handedly programmed ET the Extra-Terrestrial in just 5 weeks: <http://www.avclub.com/article/howard-scott-warshaw-13912>
- [4] How to perform the Old Man glitch in Pokémon Red and Blue: <http://kotaku.com/how-to-do-the-missingno-glitch-in-pokemon-red-and-blue-1761583087>
- [5] The Cutting Room Floor page about MissingNo: https://tcrf.net/Pok%C3%A9mon_Red_and_Blue/MissingNo
- [6] "Screwup means Assassin's Creed Unity's patch is the 40GB full game on Xbox one": <http://www.polygon.com/2014/12/17/7407869/assassins-creed-unity-glitch-broken-problems-xbox-one-patch>
- [7] Duke Nukem developer goes bust, Veteran game developer 3D Realms has closed down because of lack of funds: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/technology/8037688.stm>



Victor Martinelli Rodríguez. Second-year student in Computer Engineering in Information Systems.

Determinación del grado de acidez de vinagres comerciales de distinta materia prima

M. Villar, N. Aranda, P. Villar, S.I. Ballesté, M. Lora, N. López, C. Pérez

Resumen—El objetivo principal de esta investigación es la determinación de la cantidad de ácido acético en diferentes vinagres comerciales mediante una valoración ácido-base para determinar el grado de acidez de los mismos, relacionarlos con las diferentes denominaciones de origen y los distintos tipos de envejecimiento. Así mismo se comprobará que cumplen los límites legales establecidos en relación a acidez y residuo seco.

Palabras Claves— Ácido acético, Vinagre, Grado de acidez, Parámetros de calidad, Valoración ácido-base, Residuo seco.

1. INTRODUCCIÓN

El vinagre, según la legislación española, se denomina como el líquido apto para el consumo obtenido por doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario "[1], [2], [3], [4]".

La variedad de materias primas utilizadas para la obtención de este producto es muy amplia, abarcando desde subproductos o excedentes agrícolas hasta sustratos de gran calidad para la elaboración de vinagres más exclusivos y apreciados.

Esta amplia variedad define hasta diez tipos de vinagres, entre los que se incluyen, el vinagre de vino, frutas, sidra, alcohol, cereales, malta, malta destilado, balsámico (con adición de mosto de uva), balsámico de sidra y un apartado de otros vinagres en el que caben otros sustratos de origen agrícola como la miel y el arroz, siendo el más común y característico de los países mediterráneos el vinagre de vino.

El vinagre de vino proviene de la actividad de las bacterias *Mycoderma aceti* que realizan la reacción química de fermentación del alcohol etílico (vino) a ácido acético (vinagre). Para que ocurra esta transformación deben existir las condiciones apropiadas de acidez, concentración del alcohol y nutrientes.

El proceso final del vinagre, y casi el más importante, es la maduración. Se hace preferiblemente en toneles de madera y dejándolos madurar el tiempo necesario dependiendo de la variedad y del tipo de vinagre. Puede estar madurando desde los 6 meses hasta varios años (vinagres de solera como el aceto balsámico). Tras el proceso de maduración se filtra, se clarifica y se pasteuriza para su posterior embotellamiento y su comercialización.

2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Los objetivos principales de esta investigación son:

1. Determinar la cantidad de ácido acético en diferentes vinagres comerciales mediante una valoración ácido-base para conocer el grado de acidez de los mismos.
2. Relacionar el grado de acidez del vinagre con las diferentes denominaciones de origen de éstos y distintos en-

vejecimientos (reserva, gran reserva...).

3. Comprobar que la acidez de los vinagres se encuentra dentro de los límites establecidos en la legislación vigente.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1. Grado de acidez en vinagres comerciales

La acidez total de un vinagre se define como la totalidad de los ácidos volátiles y fijos que contiene el vinagre expresada en gramos de ácido acético en 100 ml de vinagre.

La acidez total se puede determinar mediante una valoración con una disolución de una base fuerte (NaOH), de concentración perfectamente conocida, estandarizada frente a ftalato ácido de potasio (patrón primario).

La disolución de ftalato se prepara pesando en la balanza analítica 0'1000 gramos de compuesto y realizando una valoración del hidróxido de sodio frente a este con fenoltaleína como indicador.

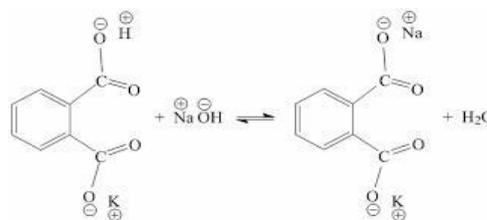


Fig. 1. Reacción de estandarización del hidróxido de sodio con ftalato ácido de potasio

3.2. pH

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidronio $[\text{H}_3\text{O}^+]$ presentes en determinadas disoluciones "[5]".

La sigla significa: "potencial hidrógeno" o "potencial de hidrogeniones"

Es muy importante conocer el grado de acidez de los vinagres (como el de cualquier alimento que vayamos a ingerir) debido a que si éste es mayor puede causarnos muchos daños. Al ingerir alimentos alteramos el pH de

nuestro cuerpo. El pH de nuestro estómago es de 1.4 debido al ácido que contiene y que es útil para descomponer los alimentos.

Algunas comidas y sus combinaciones pueden provocar que el estómago genere más ácido. Si esto sucede con mucha frecuencia, el ácido podría perforar el estómago causando una úlcera. Demasiado ácido en el estómago podría escapar hacia el esófago y llegar hasta tu boca.

3.3. Residuo seco

Se denomina residuo seco al conjunto de todas las sustancias que, en ciertas condiciones, no se evaporan, volatilizan o sufren alteraciones.

El objetivo de la determinación del residuo seco total es la detección de algunos fraudes, como la adición de agua o disoluciones acuosas de ácido acético, en el que el residuo seco es muy débil, o la adición de sustancias no volátiles, donde el residuo seco es muy elevado.

4. MATERIALES Y REACTIVOS

Matraces aforados de 50mL
Matraces erlenmeyer
Pipetas aforadas de 10 mL y 5 mL
Probetas de 10 ml
Vasos de precipitados de 50 mL
Buretas de 25 mL
Embudos Balanza analítica
pH-metro Granatario Baño de arena
Estufa
Cápsulas de porcelana Fenolftaleína
NaOH
Ftalato ácido de potasio

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Determinación del grado de acidez de vinagres comerciales

La determinación del ácido acético en vinagres se realizará mediante una volumetría ácido-base con fenolftaleína como indicador. Para ello se introducen 3 ml de la muestra de vinagre comercial en un matraz erlenmeyer y se diluye con 50 ml de agua destilada añadiéndose 3 gotas de fenolftaleína. La base utilizada es una disolución de hidróxido sódico 0'1 M previamente estandarizada con ftalato ácido de potasio.

5.2. Cálculo del pH

Para realizar medidas exactas se utiliza un pH-metro, que mide el pH por un método potenciométrico.

1. Introducimos el electrodo en una disolución tampón de pH 7. Dejamos el electrodo en la solución unos 30 segundos, y se establece pH 7.

2. Enjuagamos y ponemos la disolución tampón de pH

4, y dejamos que el medidor se estabilice, y se establece el pH 4.

3. Enjuagamos el electrodo para eliminar cualquier resto de líquido. Se introduce el electrodo en la muestra de vinagre.

4. Luego de que la lectura de pH se estabiliza, se lee el pH de la muestra.

5.3. Determinación del residuo seco

Para averiguar el residuo seco introduciremos 10 mL de la muestra de vinagre a analizar en una cápsula de porcelana de fondo plano, de la cual habremos determinado su masa anteriormente en una balanza analítica.

Una vez preparadas las muestras, (estas serán sometidas a) se colocan en un baño de arena a una temperatura de 100 °C durante 30 minutos y posteriormente serán introducidas en una estufa de agua durante 2 horas y 30 minutos. Pasado el tiempo y recién extraídas las cápsulas de la estufa se dejan enfriar en un desecador para extraer la humedad. Una vez extraída la humedad se debe pesar inmediatamente en una balanza analítica.

Es necesario usar las mismas cápsulas y respetar rigurosamente los periodos de tiempo establecidos.

Para determinar la cantidad de residuo seco total se debe emplear la siguiente fórmula:

$$\text{Residuo seco en mg/l} = (R-T) \times 1000 : V$$

Donde:

R= Peso del recipiente con el residuo en

mg. T= Tara del recipiente vacío en mg.

V= ml de muestra utilizados

Los resultados serán expresados en g/L.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para realizar esta investigación, se analizaron vinagres procedentes de diferentes materias primas. Se calculó la acidez total, el pH y el residuo seco de las muestras. El análisis de la acidez total se realizó por triplicado, obteniéndose la desviación estándar de los resultados. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 1.

Como se puede observar en la tabla, hay vinagres que no cumplen la legislación vigente. Es muy probable que los vinagres que no cumplen la normativa hayan sufrido alteraciones de alguna forma, ya sea, porque llevan mucho tiempo abierto, no se haya conservado en las condiciones óptimas o las muestras trabajadas en laboratorio hayan podido llegar a ser contaminadas.

TABLA 1
VALORES DE ACIDEZ TOTAL, pH Y RESIDUO SECO EN VINAGRES
PROCEDENTES DE DIFERENTES MATERIAS PRIMAS.

Muestra	pH	Acidez (%)	Acidez según la legislación (%)	Residuo seco (g/L)	Residuo seco según la legislación (g/L)	Cumple la legislación
4: Condado de Huelva reserva	2,7	7,027% ±0,12 %	≥7%	13,29 g/L	≥1,3g/L	si
5: Condado de Huelva reserva		9,92% ±0,00	≥7%		≥1,3g/L	si
6: Condado de Huelva Crianza	2,29	7,90% ±2,08%	≥7%	12,72g/L	≥1,3g/L	si
12: Jerez Reserva	2,52	8,1% ±0,00	≥8%	5,07 g/L	≥2,3 g/L	si
15: Crianza Jerez	2,66	6,17% ±0,00	≥7%	16,29 g/L	≥1,3g/L	no
16: Crianza Jerez	2,67	6,20% ±0,00	≥7%		≥1,3 g/L	no
21: Montilla Moriles Crianza	2,5			20,42 g/L	≥1,3 g/L	
25: Montilla Moriles Reserva		10,83%	≥6%		≥1,3 g/L	si
26: Reserva Montilla Moriles		9,79%	≥6%	20,73 g/L	≥1,3 g/L	si
28: Montilla Moriles Gran Reserva	2,84	8,69%	≥6%	20,73 g/L	≥1,3 g/L	si

7. CONCLUSIONES

Analizando los resultados hemos visto que todos los vinagres cumplen la legislación vigente en cuanto al grado de acidez. Sólo algunos de ellos no la cumplen probablemente debido a una mala conservación de los mismos o a una posible contaminación en la muestra.

Con respecto a las denominaciones de origen (Montilla-Moriles, Condado de Huelva y Jerez) y el tipo de vinagre (Crianza, Reserva y Gran Reserva) los vinagres cumplen los requisitos descritos en la legislación en cuanto al grado de acidez para cada uno de ellos presentando los Reserva y Gran Reserva mayor grado de acidez que los Crianza. El vinagre de fruta es el que presenta menor grado de acidez.

Se ha llevado a cabo la determinación de la acidez de

cada vinagre por duplicado y calculado la desviación estándar para establecer la dispersión de los resultados, obteniéndose desviaciones estándar inferiores al 2%. De algunos vinagres no se ha podido calcular la desviación estándar al no realizarse duplicado de las mismas por falta de tiempo.

Se ha determinado el residuo seco de cada vinagre, cumpliendo en todos los casos la legislación vigente según la materia prima y la denominación de origen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la Universidad de Sevilla, a la Facultad de Química y a su Ilma. Sra. Decana Prof. Dra. María Pilar Malet Maenner permitirnos llevar a cabo este trabajo de investigación.

En especial queremos mostrar nuestro agradecimiento a la Prof. Dra. Mercedes Villar Navarro, a la estudiante de doctorado Noemí Aranda Merino, investigadoras tutoras de nuestro proyecto, y la Dra. Pilar Villar Navarro, profesora de química en el I.E.S. Ítaca (Tomares). Agradecemos sus orientaciones y disponibilidad, haciendo de este proyecto una experiencia muy positiva y enriquecedora.

A la Dra. Raquel Callejón, de la Facultad de Farmacia, por suministrarnos las muestras de vinagres que procesamos en el proyecto.

Así mismo, agradecer a la Coordinadora del Proyecto Jóvenes con Investigadores, Carolina Clavijo Aumont, y al centro educativo, I.E.S. Ítaca (Tomares, Sevilla) por su apoyo.

REFERENCIAS

- [1] BOE: Disposiciones generales, Ministerio de la Presidencia: Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, por el que se establece la norma de calidad para la elaboración y comercialización de los vinagres.
- [2] BOE: Otras disposiciones, Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino: Resolución del 24 de marzo de 2009, de la dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida <<Vinagre de Jerez>>.
- [3] BOE: Otras disposiciones, Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino: Resolución del 26 de marzo de 2009, de la dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida <<Vinagre de Condado de Huelva>>.
- [4] BOE: Otras disposiciones, Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino: Resolución del 16 de noviembre de 2009, de la dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida <<Vinagre de Montilla Moriles>>.
- [5] <https://es.wikipedia.org/wiki/PH>.



Mercedes Villar Navarro recibió el título de Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Sevilla en 2005, y de Doctora en Ciencias Químicas en 2008 por la Universidad de Sevilla. Desde 2012 es profesora contratada doctor de la Universidad de Sevilla.

Noemí Aranda Merino es licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Sevilla y actualmente está realizando sus estudios de doctorado.

Pilar Villar Navarro recibió el título de Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Sevilla en 2000, y de Doctora en Ciencias Químicas en 2004 por la Universidad de Sevilla. Desde 2010 es profesora funcionaria de Educación Secundaria de la Junta de Andalucía. Actualmente imparte docencia en el IES Ítaca de Tomares (Sevilla).

Santiago Isaí Ballesté Jaramillo, Mónica Lora Martín, Celia Pérez Becerra y Noelia Pérez Domínguez son alumnos de 1º de Bachillerato de los Centros públicos IES Ítaca de Tomares (Sevilla), IES Chaves Nogales (Sevilla), IES Martín Rivero de Ronda (Málaga) e IES Juan Ciudad Duarte de Bormujos (Sevilla), respectivamente.



Artículo realizado por
Carmen Espejo Serrano

USO TERAPÉUTICO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES: GRAN AVANCE EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Los anticuerpos monoclonales están adquiriendo cada vez mayor importancia en el tratamiento de diversas enfermedades, así como en el diagnóstico clínico, ya que suponen una ventaja frente al uso de anticuerpos policlonales debido a su elevada especificidad y homogeneidad. En este artículo se revisarán las principales aplicaciones terapéuticas que presentan los anticuerpos monoclonales en la actualidad, que varían desde el tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunes, hasta su uso en oftalmología o en el asma.

Palabras clave | *Anticuerpo monoclonal, receptor, inhibición, enfermedad y tratamiento.*

1. INTRODUCCIÓN

¿Qué son los anticuerpos monoclonales y cómo se obtienen?

Los anticuerpos monoclonales (mAB) son producidos por una célula híbrida (hibridoma) que deriva de la fusión de un clon de linfocitos B y una célula madre.

La técnica que permite el cultivo de los hibridomas fue descubierta por Niels K. Jerne, Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975. La célula B productora de los anticuerpos deseados se consigue mediante la inmunización de un ratón contra el antígeno de interés. A continuación, se produce la extracción y posterior disociación del bazo en un medio de cultivo (HAT), el cual contiene células de mieloma de ratón con capacidad de división indefinida, con el fin de liberar los linfocitos B residentes. Mediante la adición posterior de polietilenglicol (PEG) a la mezcla, se producirán varias uniones de los dos tipos de células para lograr la formación de los hibridomas. El último paso consistirá en la separación de los hibridomas fusionados de los que no lo han hecho y de las células del mieloma, y cultivarlos individualmente para la detección de los anticuerpos de interés.

¿Qué ventajas presenta el uso de anticuerpos monoclonales?

La obtención de anticuerpos de forma tradicional mediante la inyección de los antígenos en varios animales, plantea varios problemas como el de la heterogeneidad de las muestras, la presencia de proteínas contaminantes del suero y la variabilidad en cuanto a la especificidad y afinidad.

Todos estos problemas parecen haber sido resueltos con la llegada de los anticuerpos monoclonales, los cuales son considerados hoy en día una herramienta indispensable en la investigación biológica y médica. De esta forma, los anticuerpos monoclonales son mucho más homogéneos (cada tipo de anticuerpo deriva de un mismo clon de linfocitos B), agregan especificidad y reproducibilidad, y permiten un mejor estudio de las reacciones antígeno-anticuerpo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los mABs también pueden producir efectos secundarios no deseados por la presencia de antígenos de ratón. Como solución a este problema, surge la idea de la producción de anticuerpos monoclonales humanizados, cuyas secuencias han sido modificadas con el fin de aumentar su similitud con los distintos anticuerpos producidos de manera natural en humanos.

2. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Los anticuerpos monoclonales son de gran utilidad en el tratamiento de diversas enfermedades, además de mostrar un papel importante en los trasplantes (anticuerpos contra los linfocitos T). Una de las aplicaciones más inmediatas aparece en el campo del diagnóstico clínico, donde los mABs son usados para la determinación de los niveles de gonadotropina coriónica (hCG) en la orina como señal de embarazo o la identificación del rotavirus que provoca diarrea en el lactante.

2.1 Enfermedades autoinmunes

Numerosos anticuerpos monoclonales son usados hoy en día para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en las cuales se producen anticuerpos contra antígenos propios. Como ejemplo de este tipo de enfermedades, destaca la **artritis reumatoide**, la cual se caracteriza por una excesiva inflamación en las articulaciones. En este caso, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es el que actúa como mediador de la inflamación, al igual que ocurre en la artritis psoriásica, por lo que los anticuerpos monoclonales existentes (infliximab y adalimumab), ejercen su acción inhibiendo a TNF- α . Además, en la artritis reumatoide también se produce una sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 e IL-6, motivo por el cual el tocilizumab (anticuerpo monoclonal humanizado usado como droga inmunosupresora) actúa como inhibidor de la señal de la IL-6 mediante su unión competitiva al receptor de la misma. [1] Por otro lado, la proliferación de las células T dependiente de CD6 (una glicoproteína de superficie en los linfocitos T maduros) para formar Th1 y Th17 juega un papel importante en la **psoriasis**. De esta forma nos encontramos con itolizumab (IgG1), el primer anticuerpo monoclonal humanizado que regula las rutas en las que CD6 está involucrada mediando la activación de los linfocitos T. Además, itolizumab también

actúa aumentando los niveles de IL-4, lo que disminuye la producción de INF- γ por parte de los linfocitos T, reduciendo por lo tanto la excesiva inflamación que caracteriza a este tipo de enfermedades. [2] Otro tipo de enfermedades autoinmunes se producen por una desregulación tanto de la inmunidad innata como de la adquirida. Como ejemplo tenemos la **enfermedad de Crohn** (inflamación del tubo digestivo), en la que la interleucina 12/23 presenta un papel importante en las respuestas inmunes adaptativas. En este contexto aparece ustekinumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que bloquea la subunidad p40 de la IL-12 y IL-23, evitando la interacción con el receptor celular (IL-12R β 1) y la consiguiente activación de citoquinas, tal y como se puede observar en la figura 1. [3]

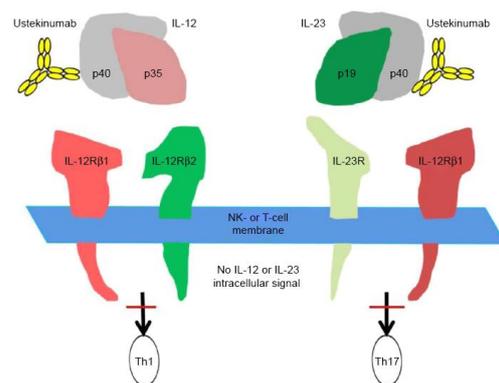


Figura 1. Modo de acción de ustekinumab ³.

2.2 Enfermedades pulmonares

Los anticuerpos monoclonales también son usados para el tratamiento del asma alérgica, caracterizada por una excesiva producción de IgE ante la respuesta a un alérgeno. En la actualidad, se está haciendo uso de un anticuerpo monoclonal denominado omalizumab el cual actúa secuestrando IgE libre y acelerando la disociación del complejo IgE y su receptor Fc. Esto provoca una desregulación de la cascada de señalización inflamatoria de IgE, disminuyendo consecuentemente las exacerbaciones del asma. [4]

2.3 Cáncer

Los anticuerpos monoclonales se presentan como uno de los principales focos de investigación en la terapia inmunológica del cáncer. Se ha visto que la combinación de la quimioterapia actual con anticuerpos monoclonales, aumenta considerablemente el efecto antitumoral de los mismos.

Los mABs se dirigen a los tumores gracias al reconocimiento de antígenos tumorales asociados (por el fragmento Fab), lo que desencadena en el reclutamiento de macrófagos, NK, células dendríticas, linfocitos T y la activación de la ruta del complemento. Este reclutamiento se consigue gracias a la interacción del fragmento Fc de la inmunoglobulina gamma (IgG), el receptor FcγRs y la proteína del complemento C1q. [5]

Centrándonos en el cáncer de mama, nos encontramos con varios anticuerpos monoclonales como el trastuzumab y pertuzumab, los cuales actúan contra el dominio extracelular de HER2 (receptor en las células mamarias). Por su parte, trastuzumab ejerce su acción inhibiendo la formación de heterodímeros de HER2, así como su rotura y promoviendo la endocitosis del receptor de HER2. [6]

Por otro lado tenemos a cetuximab, un anticuerpo monoclonal del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual bloquea la progresión de tumores, sobre todo en el cáncer de colon, de cabeza y de cuello. Cetuximab inhibe la unión del ligando EFG y del factor de crecimiento de tumores (TGFα) con el receptor EGFR, evitando por tanto la activación del receptor del ligando tirosina kinasa. Además, este mAB también inhibe la formación de homodímeros y heterodímeros entre EGFR y HER2, así como la neovascularización, y promueve la apoptosis. [7]

2.4 Degeneración macular

Los anticuerpos monoclonales existentes para esta enfermedad, caracterizada por una vascularización anormal en la retina, se

encargan de bloquear a VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y son administrados mediante inyecciones intravítreas. Como ejemplo tenemos a ranibizumab, un fragmento de anticuerpo monoclonal (Fab) dirigido contra VEGF. [8]

2.5 Alzheimer

El Alzheimer es una patología caracterizada por una neurodegeneración y deterioro cognitivo. Aunque aún es necesaria una mayor investigación, se piensa que el uso de anticuerpos monoclonales como bapineuzumab, puede favorecer la eliminación de especies de beta-amiloide tóxicas acumuladas en los pacientes, bien directamente o mediante la activación de la cascada del complemento. [9]

3. CONCLUSIONES

Los anticuerpos monoclonales son ampliamente usados en la práctica clínica para el tratamiento de numerosas enfermedades debido principalmente a la elevada especificidad y versatilidad que muestran. Esto permite una mayor selectividad hacia las células diana, así como la reducción de aparición de reacciones inmunológicas impropias gracias al uso de mABs humanizados.

Numerosas investigaciones se están llevando a cabo en la actualidad con el fin de desarrollar nuevos mABs que sean capaces de detectar compuestos de bacterias o virus, combinaciones de varios ya existentes e incluso con capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, aún hay que terminar de esclarecer los posibles efectos secundarios que dichos anticuerpos puedan causar en el organismo en el que son administrados.

REFERENCIAS

- [1] Lee, H., Bhang, S. H., Lee, J. H., Kim, H., & Hahn, S. K. (2017). *Tocilizumab–Alendronate Conjugate for Treatment of Rheumatoid Arthritis. Bioconjugate Chemistry.*
- [2] Dogra, S., Uprety, S., & Suresh, S. H. (2017). *Itolizumab, a novel anti-CD6 monoclonal antibody: a*

safe and efficacious biologic agent for management of psoriasis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, (just-accepted).

[3] Deepak, P., & Loftus Jr, E. V. (2016). Ustekinumab in treatment of Crohn's disease: design, development, and potential place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 3685.

[4] Navinés-Ferrer, A., Serrano-Candelas, E., Molina-Molina, G. J., & Martín, M. (2016). IgE-Related Chronic Diseases and Anti-IgE-Based Treatments. *Journal of Immunology Research*, 2016.

[5] Saxena, A., & Wu, D. (2016). Advances in Therapeutic Fc Engineering—Modulation of IgG-Associated Effector Functions and Serum Half-life. *Frontiers in Immunology*, 7.

[6] Lv, Q., Meng, Z., Yu, Y., Jiang, F., Guan, D., Liang, C., & Zhang, G. (2016). Molecular Mechanisms and Translational Therapies for Human Epidermal Receptor 2 Positive Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2095.

[7] Sutandyo, N. (2016). New Paradigm in Treating Cancer: Right on Target. *Acta Medica Indonesiana*, 48(2), 139.

[8] Feltgen, N., Bertelmann, T., Bretag, M., Pfeiffer, S., Hilgers, R., Callizo, J. & Hoerauf, H. (2017). Efficacy and safety of a fixed bimonthly ranibizumab treatment regimen in eyes with neovascular age-related macular degeneration: results from the RABIMO trial. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 1-12.

[9] Prins, N. D., & Scheltens, P. (2013). Treating Alzheimer's disease with monoclonal antibodies: current status and outlook for the future. *Alzheimer's research & therapy*, 5(6), 56.

Uso de nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes

Jennifer Soler Beatty

Resumen— La diabetes mellitus es un desorden metabólico prevalente asociado a la obesidad y a la falta de ejercicio físico, que conlleva el aumento de la glucosa en plasma. La hiperglucemia puede desencadenar complicaciones tales como la ceguera, enfermedades del hígado o corazón, neurodegeneración y mayor susceptibilidad a infecciones. Por esta razón, el control de la glucemia a largo plazo es clave para determinar el pronóstico del paciente con diabetes. La nanotecnología permite, mediante un amplio abanico de herramientas, mejorar la calidad de vida de los pacientes con diabetes. Entre ellas destacan: El uso de NPs como agentes de contraste para la visualización de los islotes pancreáticos; sensores de glucosa precisos y sensibles, que permiten la detección a tiempo real de niveles de glucosa en plasma; sistemas de detección precoz de la diabetes y terapias no invasivas de liberación controlada de insulina. Asimismo, la nanotecnología nos permite el desarrollo de vacunas más eficientes y tratamientos alternativos basados en terapia génica. En este artículo se revisarán algunas de las estrategias a nanoescala utilizadas para el diagnóstico, tratamiento y monitorización de dicha enfermedad.

Palabras Claves— Diabetes mellitus, nanopartículas de plata, GLP-1, nanohilos, exenatida, sensores de glucosa, insulina oral

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus se define como un grupo de desórdenes metabólicos, caracterizados por niveles de glucosa en sangre elevados (hiperglucemia). Muchas de las complicaciones asociadas a la diabetes son consecuencia de daños producidos en las células β pancreáticas, debido a un incremento del estrés oxidativo [1]. La diabetes tipo 2 (T2DM) es la enfermedad metabólica más prevalente, y constituye el 90% de todos los casos. La T2DM se caracteriza por resistencia a la insulina, alteración en la homeostasis de la glucosa y disfunción de las células β . El otro 10 % de los casos corresponde a la diabetes tipo 1 (T1DM), que resulta de una deficiencia en la producción de insulina como consecuencia de una respuesta autoinmune. Esta falta de tolerancia inmunológica conlleva a la destrucción de las células β mediada por linfocitos T (hipoinsulinemia). Los tratamientos antidiabéticos actuales incluyen sulfonilureas, biguanida, meglitinida, inhibidores α glucosidasas y tiazolidinedionas. Sin embargo, el uso de dichos fármacos está limitado por sus efectos secundarios como intolerancia gastrointestinal, aumento del peso corporal y formación de edemas. Por consiguiente, es necesaria la generación de nuevas terapias que minimicen los efectos adversos, así como, de forma conjunta, nuevos sistemas de diagnóstico temprano y monitorización de la enfermedad [2].

2. DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES MEDIANTE EL USO DE NANOPARTÍCULAS

2.1. Nanopartículas de TiO_2 funcionalizadas en nanohilos de In_2O_3

La funcionalización de nanohilos de In_2O_3 con nanopartí-

culas de TiO_2 ha permitido una elevada selectividad y sensibilidad para la detección del vapor de acetona. La capacidad de detectar la acetona en el rango de la ppm es importante para el diagnóstico de la diabetes. Esto es debido a que en el exhalado de los pacientes con diabetes la concentración de vapor de acetona oscila entre 1.8-10 ppm, mientras que el individuo normal está por debajo de las 0.8 ppm. Se evaluó que la sensibilidad del sensor aumentaba de forma lineal con respecto a la concentración de acetona, atendiendo al modelo de depleción superficial. Este modelo se basa, en que en presencia de aire sobre la superficie de los nanohilos se adsorben moléculas de O_2 , que por transferencia de electrones (e^-) del In_2O_3 , inducen la formación de iones O^- , lo que conlleva a un aumento en la resistencia del nanohilo a la conducción de la corriente. Sin embargo, en presencia de vapores de acetona, las especies de acetona adsorbidas en el nanohilo, por una serie de reacciones secuenciales, extraen $12 e^-$ de los iones O^- . Estos e^- son revertidos a los nanohilos, lo que conlleva un descenso en la resistencia del semiconductor, y, por tanto, se incrementa la conductividad del nanohilo. La funcionalización del nanohilo con nanopartículas de TiO_2 genera 'n-n junctions' donde los e^- permanecen atrapados, lo que provoca que en presencia de oxígeno el canal de conducción se reduzca en mayor proporción en comparación a los nanohilos no funcionalizados. Esto conlleva que la sensibilidad de dichos sensores funcionalizados sea mayor puesto que la anchura de la capa de depleción en los nanohilos cambia de forma más drástica [3].

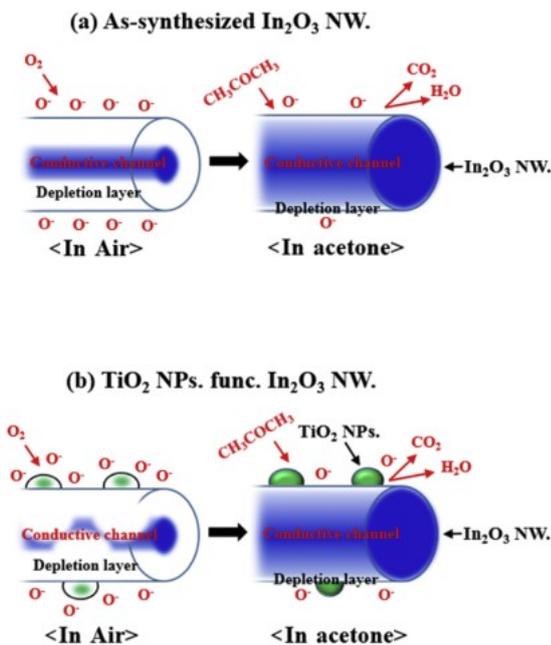


Fig. 1. Esquema de la estructura eléctrica de (a) nanohilos de In_2O_3 y (b) funcionalizados con nanopartículas de TiO_2 expuestos a aire o vapores de acetona

2.2. Detección electroquímica mediante nanopartículas de plata

Mutaciones en el DNA mitocondrial (DNAm_t) están asociadas a la aparición de la T2DM, siendo la mutación más común el polimorfismo A3243G en el gen que codifica el tRNA para la leucina. La detección de dicho polimorfismo permitiría el diagnóstico temprano y el tratamiento de los pacientes con T2DM. El sensor se fundamenta en el crecimiento de nanopartículas de plata (AgNP) mediante un soporte de DNA sobre una superficie de nanotubos de carbono (SWCNTs: single walled carbon nanotubes) absorbidos en un electrodo GCE (glass carbon electrode). Como mecanismo de amplificación de la señal se incorporará una RNAasa HII. Además, el sistema cuenta con sondas de captura (SP) conjugadas a microbolas de sílica (SiMBs). La SP presenta un ribonucleótido en la región intermedia que es reconocido por la RNAasa HII e hibrida de forma específica con la mutación que se pretende analizar. La RNAasa HII hidroliza el enlace fosfodiéster 5' del ribonucleótido en la unión DNA-RNA liberando ssDNA que corresponden a la sonda señal (SP). Estos SPs actúan como molde para el crecimiento *in situ* de AgNP. Finalmente, se evaluó que la señal electroquímica, por la transformación en estado sólido de AgNPs a AgCl en la superficie del electrodo, tiene una relación lineal con la cantidad de DNAm_t diana. Entre las múltiples ventajas de dicho sistema de detección se puede mencionar que no necesita el marcaje previo de la muestra y un límite de detección del orden de pM [4].

2.3. Nanopartículas supermagnéticas como agentes de contraste en MRI y sensores de glucosa

Las NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs)

nos permiten la cuantificación *in vivo*, de forma no invasiva, de la masa total de células β en los islotes de Langerhans. Además, son biocompatibles y se pueden degradar en hierro y oxígeno. Actualmente, han sido utilizadas para monitorizar infiltración linfocitaria en el páncreas, para una detección temprana de la diabetes [5]. Por otro lado, se han empleado nanocubos de óxido de hierro ferromagnético para aumentar la resolución de la MRI. Estas NPs permiten la visualización de células individuales en los islotes pancreáticos [6].

Entre los sensores de glucosa, se pueden mencionar las NPs de paladio, oro, platino o nanotubos de carbono en combinación con la glucosa oxidasa. La glucosa, al unirse a la enzima, se oxida en pasos sucesivos hasta dar lugar a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Durante la oxidación de la glucosa se genera una corriente eléctrica, proporcional a la concentración de la glucosa. Entre los sensores no enzimáticos se puede destacar las moléculas de unión a glucosa como la lecitina ConA (concanavalina A) y PBA (fenilborónico). Cuando la glucosa se une al sensor provoca un desplazamiento de la densidad de electrones que se puede medir con una señal de salida de fluorescencia o de voltaje. Finalmente se están intentando diseñar sensores basados en la emisión de fluorescencia mediante el uso de quantum dots [7].

3. TRATAMIENTO DE LA DIABETES CON NANOPARTÍCULAS

3.1. Sistemas de liberación de insulina dependientes de sensores de glucosa

Los sensores mencionados anteriormente pueden utilizarse acoplados a sistemas de liberación de insulina en respuesta a glucosa plasmática. Uno de los mecanismos propuestos es el uso de NPs constituidas por polímeros sensibles al pH, como el quitosano, combinados con la enzima glucosa oxidasa. Esta enzima, al convertir la glucosa en ácido glucónico, reduce el pH del microambiente, produciendo la liberación de la insulina encapsulada, por alteración en la estructura de la NP [8].

Otro sistema en fase I, es el 'Smart Insulin' L-490 que utiliza la capacidad de la lecitina ConA para unirse a la glucosa. Cuando las concentraciones de glucosa en plasma son bajas, el elemento de unión ConA interacciona con la insulina evitando que ejerza su acción. Mientras que, a niveles altos de glucosa, esta se une a los sitios ConA de la nanopartícula polimérica produciendo la liberación de la insulina [7].

Por último, mencionar la encapsulación de insulina en NPs de PLGA. Estas NPs producen una liberación basal de insulina en condiciones normales, pero está se ve incrementada por exposición a ultrasonidos. Esto es debido a que la exposición a ultrasonidos altera la difusión de la insulina por la matriz, como consecuencia del calentamiento y la cavitación. Este sistema permitiría mediante una sola inyección almacenar grandes cantidades de insulina de forma subcutánea e ir liberándola de forma sostenida

mediante un sistema de ultrasonido localizado [9].

3.2. Nanopartículas inorgánicas de óxido de zinc

Se ha utilizado la combinación de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONPs) con fármacos antidiabéticos estandarizados (vildagliptina) para restaurar la función y estructura de células β . Se evaluó que la administración de las NPs en modelos de rata con diabetes tipo 2 inducida, mejoraba las alteraciones asociadas como la tolerancia a la glucosa, niveles de fructosamina, actividad SOD pancreática, biomarcadores de diabetes (miR103, miR-143), histología de los islotes, hemoglobina glicosilada y alteración de lípidos en plasma. Por lo tanto, las ZnONPs junto a la vildagliptina presentan un efecto sinérgico para el tratamiento de la diabetes tipo 2 [1].

3.3. Nanocomplejos de quitosano basados en terapia génica

La hormona incretina GLP-1 (glucagón-like peptide) está relacionada con un incremento en la secreción de insulina estimulada por glucosa. Además, estimula el crecimiento de las células β e inhibe su apoptosis. Sin embargo, presenta una baja biodisponibilidad como consecuencia a su degradación por la endoproteasa DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV). Para aumentar la biodisponibilidad de GLP-1 se combinó con el polímero catiónico quitosano (CH), que es capaz de formar nanocomplejos con ácidos nucleicos. Por lo tanto, se utilizaron dichos nanocomplejos para la liberación *in vitro* de GLP-1, análogos de GLP-1 resistentes a DPP-IV y siRNA dirigidos a la DPP-IV. Por último, mencionar que dicho sistema logró un silenciamiento eficiente similar al producto comercial DharmaFect™, pero con menor efecto citotóxico. Por lo tanto, el uso de nanocomplejos de CH y ácidos nucleicos podría utilizarse como terapia combinada para el tratamiento de la T2DM [2].

3.4. Liberación controlada de exenatida

La exenatida es un antagonista de GLP-1 que se utiliza como terapia combinada para la T2DM. Debido a su pequeño tamaño se elimina rápidamente por filtración glomerular. Para aumentar su vida media en plasma y evitar la degradación enzimática, se apuesta por sistemas de encapsulación. Un ejemplo, es la generación de estructuras multicapa de nanopartículas de L- α fosfatidilcolina incorporadas en una bicapa lipídica, mediante la adición de ácido plurónico. Durante la liofilización, la región hidrofóbica del ácido plurónico permite que se ancle de forma física a la superficie del liposoma de lecitina, permitiendo el diseño de una multicapa de nanopartículas. Este sistema de encapsulación no altera la estructura del compuesto activo, y se produce una eficiencia de encapsulación del 85-87%. Esta multicapa de nanopartículas permite una liberación sostenida de la exenatida, que correlaciona con la actividad antidiabética más prolongada *in vivo*. Por consiguiente, los sistemas de multicapa de NPs pueden utilizarse como vehículos de liberación sostenida de fármacos de origen proteico [10].

Este sistema se implementó mediante la formación de un hidrogel termorreversible por combinación con plurónico

F-127. *In vivo*, mediante inyecciones subcutáneas en ratones db/db y monitorización de glucosa en plasma, se determinó que el hidrogel mejora los efectos antidiabéticos de la exenatida, y que el retorno de los niveles de glucosa a sus valores originales, se produce de forma más gradual [11].

3.5. Administración oral de insulina

El principal inconveniente de la administración oral de la insulina es su baja biodisponibilidad, debido a procesos de degradación por pH ácido y proteasas, y su baja permeabilidad a nivel del epitelio intestinal. Para mejorar la entrada de insulina a las células, se han desarrollado nanopartículas dirigidas a enterocitos y células M de la mucosa, mediante la funcionalización con lecitina. Además, se ha diseñado un sistema basado en nanopartículas de polietilimina para la liberación de la insulina a nivel del colón.

La liberación controlada de la insulina a nivel del colón presenta varias ventajas, como unos efectos hipoglucémicos a largo plazo. Además, permite la liberación fisiológica de la insulina a la vena portal, lo que evita fluctuaciones de los niveles plasmáticos de glucosa y efectos secundarios de la administración subcutánea como: hiperinsulinemia sistémica, ganancia de peso, aterogénesis, lipodistrofia local y aumento de la lipogénesis [12].

Otro ejemplo es el uso de NPs de alginato y sulfato de dextrano recubiertas con quitosano y albúmina (^{99m}Tc -BSA) y cargado con insulina para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y 2. En el caso de la diabetes tipo 1 consigue aumentar los efectos antihyperglucémicos durante 12h y un incremento de la biodisponibilidad de 5.04 %, en comparación a la administración subcutánea. Además, dichas NPs presentan las ventajas de que no son absorbidas a nivel sistémico y permiten mayor residencia en el epitelio intestinal. Esto es debido a la capacidad del quitosano de unirse a los residuos de ácido siálico presentes en la mucosa intestinal. Por lo tanto, dichas NPs son capaces de mantener la estabilidad durante su paso por el aparato gastrointestinal y evitan la liberación prematura de la insulina. También producen un efecto antihyperglucémico más sostenido y a largo plazo, y aumentan la entrada de la insulina por las células del intestino [13].

3.6. Nanopartículas de poli(láctida-co-glicólico) acopladas con Ag (Ag-PLG) para el tratamiento de T1D

Actualmente se apuesta por terapias que vayan dirigidas de forma específica a las células autoinmunes para prevenir y revertir la T1DM, sin la administración de inmunosupresores. Una estrategia, es la inducción de tolerancia de linfocitos T autorreactivos utilizando nanopartículas sintéticas que están entrecruzadas con antígenos dianas importantes en la patogenicidad, mediante etilencarboimidida (ECDI). El efecto terapéutico de dichas nanopartículas requiere la expresión de MARCO, un receptor expresado en células fagocitarias. Este receptor permite la entrada y presentación de los antígenos diabéticos por parte

de células presentadoras de antígenos (APC) tolerogénicas. Las APC tolerogénicas inducen anergia y apoptosis de linfocitos T autorreactivos, mediante el aumento de la expresión de PD-L1, que modula la señal co-estimuladora. Además, inducen anergia en linfocitos T naïve mediante la presentación del antígeno junto al MHC en ausencia de una señal co-estimuladora (CD80/CD86). Por último, la expresión de PD-L1 y la producción de IL-10 por parte de las APC tolerogénicas induce la expresión de linfocitos Treg, que inhiben la diferenciación de linfocitos T naïve y la función de los linfocitos T patogénicos. En conclusión, las nanopartículas manufacturadas con autoantígenos, antígenos encapsulados o sustancias que promueven la tolerancia en nanoesferas, son un sistema óptimo para revertir el carácter autoinmune de la T1DM [14].

3.7. Otras terapias alternativas

Una de las terapias propuestas, es el uso de nanocapas para proteger las células trasplantadas frente al sistema inmune, a la vez que permiten una difusión adecuada de glucosa, oxígeno, insulina y de otros nutrientes necesarios. Para lograr dicho objetivo, se han desarrollado sistemas mono o multi-capa de recubrimiento que protejan los islotes de Langerhans, sin inhibir su función. Un ejemplo, es el empleo de nanopartículas poliméricas PEG, mediante el método de autoensamblaje capa por capa gracias a la afinidad de los grupos PPB (biotina) y SA (estreptavidina) [15].

Otra estrategia es la utilización de SPIONs para inducir la producción de insulina en células β , mediante hipertermia por aplicación externa de una corriente magnética alterna [16].

Por último, mencionar el uso de vacunas como estrategia a largo plazo para prevenir la destrucción autoinmune de las células β en T1DM. El uso de NPs en vacunas permite la eliminación de la necesidad de utilizar adyuvantes y puede direccionar antígenos a regiones específicas del organismo. Además, constituyen plataformas físicas que confieren la propiedad de combinar antígenos. Un ejemplo, es el uso de NPs magnéticas recubierta con péptidos apropiados unidos al MHC (p-MHC-NPs) [17].

4. CONCLUSIONES

La investigación en nanotecnología y nanomedicina ha permitido el desarrollo de terapias y herramientas de diagnóstico temprano más eficaces. Las NPs orgánicas, inorgánicas o híbridas permiten transportar de forma segura y eficiente la insulina o análogos. Además, algunas de las NPs presentan actividad biológica que ayuda de forma combinada en el tratamiento y la prevención de la diabetes mellitus, y sus complicaciones asociadas. Esto se logra mediante actividad antioxidante, anti-apoptótica o la capacidad de mimetizar la acción de la insulina. También, las NPs presentan unas propiedades fisicoquímicas que les permiten ser utilizadas como herramientas de diagnóstico precoz y monitorización de la enfermedad de forma no invasiva.

Atendiendo a la información aportada, se prevé una oportunidad prometedora en el desarrollo de sistemas a nanoescala que combinen la liberación controlada de insulina acoplada a un sensor de glucosa. A pesar de ser un campo en auge, se requiere el desarrollo de nanosensores de mayor sensibilidad y especificidad, y reducir el tiempo entre la detección y la liberación terapéutica. No obstante, por los resultados que se están obteniendo se espera que la nanotecnología juegue un papel importante en la mejora del manejo de la diabetes en la próxima década.

Referencias

- [1] El-Gharbawy R, Emara A and Abu-Risha S, "Zinc oxide nanoparticles and a standard antidiabetic drug restore the function and structure of beta cells in Type-2 diabetes", *Biomedicina & Pharmacotherapy*, vol. 84, pp. 810-820, Jun/Sep 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.068
- [2] Jean M, Alameh M, De Jesus D *et al.* "Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, pp. 130-149, Jun/Oct 2011 doi: 10.1016/j.ejps.2011.10.029
- [3] Park S, "Acetone gas detection using TiO₂ nanoparticles functionalized In₂O₃ nanowires for diagnosis of diabetes", *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 696, pp. 655-662, Mar 2017 doi: 10.1016/j.jallcom.2016.11.298
- [4] Tao J, Zhao P, Zheng J *et al.* "Electrochemical detection of type 2 diabetes mellitus-related SNP via DNA-mediated growth of silver nanoparticles on single-walled carbon nanotubes", *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 86, pp. 15704-15707 Jan 2015 doi: 10.1039/x0xx00000x
- [5] Veisah O, Gunn J and Zhang M, "Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging", *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 3, pp. 284-304 Mar 2010 doi: 10.1016/j.addr.2009.11.002
- [6] Lee N, Kim H, Choi S *et al.* "Magnetosome-like ferromagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 7, pp. 2662-2667 Jan/Nov 2011 doi: 10.1073/pnas.1016409108
- [7] Veiseh O, Tang B, Whitehead K *et al.* "Managing diabetes with nanomedicine: challenges and opportunities", *Nature Reviews*
- [8] Gu Z, Dang T, Ma M *et al.* "Glucose-Responsive Microgels Integrated with Enzyme Nanocapsules for Closed-Loop Insulin Delivery", *ACS Nano*, vol. 7, no. 8, pp. 6758-6766 Jul 2013 doi: 10.1021/nn401617u
- [9] Di J, Price J, Gu X *et al.* "Ultrasound-Triggered Regulation of Blood Glucose Levels Using Injectable Nano-Network", *Advanced Healthcare Materials*, vol. 3, no. 6, pp. 811-816 Nov 2013 doi: 10.1002/adhm.201300490
- [10] Kim J, Lee H, Oh K *et al.* "Multilayer nanoparticles for sustained delivery of exenatide to treat type 2 diabetes mellitus", *Biomaterials*, vol. 34, no. 33, pp. 8444-8449 Jun/Jul 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.040
- [11] Oh K, Kim J, Yoon B *et al.* "Sol-gel transition of nanoparticles/polymer mixtures for sustained delivery of exenatide to treat type 2 diabetes mellitus", *European Journal of Pharmaceu-*

tics and Biopharmaceutics, vol. 88, no. 3, pp. 664-669, May/Au 2014 doi: 10.1016/j.ejpb.2014.08.004

- [12] Mazzucchelli S and Corsi F, "Diabetes management strategies: can nanoparticles be used to therapeutically deliver insulin?", *Therapeutic Delivery*, vol. 8, no. 2, pp. 49-51 Nov 2016 doi: 10.4155/tde-2016-0081
- [13] Lopes M, Aniceto D, Abrantes M *et al.* "In vivo biodistribution of antihyperglycemic biopolymer-based nanoparticles for the treatment of type 1 and type 2 diabetes", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 113, pp. 88-96 doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.037
- [14] Prasad S, Xu D and Miller S, "Tolerance Strategies Employing Antigen-Coupled Apoptotic Cells and Carboxylated PLG Nanoparticles for the Treatment of Type 1 Diabetes", *The Review of Diabetic Studies*, vol. 9, no. 4, pp. 319-327 Dec 2012 doi: 10.1900/RDS2012.9.319
- [15] Wilson J, Cui W and Chaikof E, "Layer-by-Layer Assembly of a Confromal Nanothin PEG Coating for Intraportal Islet Transplantation", *Nano Letters*, vol. 8, no. 7, pp. 1940-1948 Jul 2008 doi: 10.1021/nl080694q
- [16] Stanley S, Gagner J, Damanpour S *et al.* "Radio -Wave Heating of Iron Oxide Nanoparticles Can Regulate Plasma Glucose in Mice", *Science*, vol. 336, no. 6081, pp- 604-608, May 2012 doi: 10.1126/science.1216753
- [17] Tsai S, Shameli A, Yamanouchi J *et al.* "Reversal of Autoimmunity by Booting Memory-like Autoregulatory T Cells", *Immunity*, vol. 32, no. 4, pp. 568-580 Apr 2010 doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.015



Jennifer Soler Beatty. Graduada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia. Actualmente cursando el máster de biotecnología sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide.

Aplicaciones nanotecnológicas en la lucha contra la malaria

Álvaro Quílez Borrachero

Resumen—La malaria es una enfermedad infecciosa causada por protozoos del género *Plasmodium*. A pesar de los esfuerzos realizados en las últimas décadas, aún es una enfermedad presente en 91 países. El complejo ciclo de vida del parásito y la aparición de resistencias frente a los fármacos tradicionalmente usados, entre otros factores, suponen un reto en la tarea de acabar con la enfermedad. Los estudios realizados con nanopartículas demuestran que estas ofrecen una prometedora alternativa a los tratamientos tradicionales. En esta revisión, se muestran ejemplos recientes que demuestran que la nanotecnología es una herramienta que puede ser de gran ayuda en el desarrollo de tratamientos, vacunas y métodos de cribado de nuevos fármacos contra la malaria, así como nuevas formas de controlar al vector.

Palabras Claves— Antimaláricos, nanotransportadores, VLPs, liposomas, RTS,S/AS01, malaria.

1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, la malaria ha sido un problema de salud global, con especial relevancia en países tropicales y subtropicales. A lo largo del siglo XX, gracias a su estudio y al uso de medidas de control, se ha logrado acabar con ella en gran cantidad de países. Sin embargo, según datos de la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad se consideró endémica en 91 países durante el año 2016 (mostrados en la figura 1), y se estima que cerca de la mitad de la población mundial está en riesgo de padecerla [1], [2].

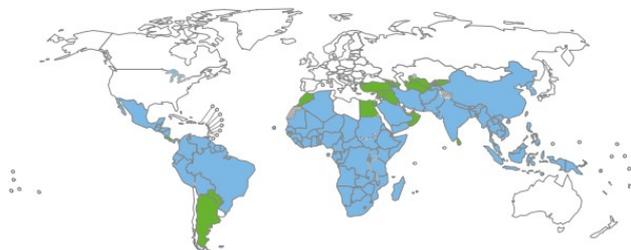


Fig.1. Países endémicos para malaria en 2000 (verde) y 2016 (azul). Informe anual de malaria de la OMS [2].

La enfermedad es causada por protozoos del género *Plasmodium*, siendo *P. falciparum* el que causa las manifestaciones más severas, y es transmitida por las hembras del mosquito *Anopheles*. El parásito presenta un ciclo de vida complejo, con fases de replicación asexual en el interior de los hepatocitos y los eritrocitos del paciente, y una fase sexual en el mosquito [1].

Son ya numerosos los estudios que muestran las ventajas que puede ofrecer la nanotecnología a la hora de abordar la erradicación de la epidemia desde diferentes abordajes, como lo son el tratamiento, la vacuna, el control del vector y el desarrollo de métodos de testeo de nuevos fármacos.

2. NANOTRANSPORTADORES

Muchos de los medicamentos tradicionalmente utilizados para tratar la malaria, como la cloroquina o la sulfadoxina-pirimetamina, han perdido su efectividad debido a que el parásito se ha vuelto resistente. Además, ya se han descrito casos de resistencia frente a tratamientos actuales basados en compuestos derivados de artemisina. Si bien la combinación de fármacos es una estrategia que ha resultado efectiva en muchos casos, esta no exime del riesgo de que aparezcan resistencias. Los sistemas de administración basados en nanopartículas pueden aumentar la efectividad de los antimaláricos, reduciendo el riesgo de aparición de resistencias. Además, pueden reducir los efectos secundarios gracias a que presentan una mayor especificidad. A esto hay que añadirle que es posible diseñar la nanopartícula de modo que libere el fármaco de forma controlada, lo que permite reducir el número de dosis y, por tanto, reducir el riesgo de incumplimiento de una correcta administración por parte del paciente [3].

Entre los sistemas de transporte basados en nanopartículas que han sido estudiados para la administración de antimaláricos se encuentran liposomas, nanopartículas sólidas lipídicas, nanoemulsiones, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lípido-polímero híbridas y dendrímeros [4]. A continuación, se muestran algunos ejemplos.

2.1. Nanotubos

La curcumina es un compuesto natural presente en *Curcuma longa* que presenta propiedades antimaláricas. Sin embargo, no posee la solubilidad y la biodisponibilidad necesarias para hacer de ella un antimalárico efectivo por sí sola. En un estudio se demostró que nanotubos formados por péptidos podrían aumentar la efectividad del compuesto. De entre varias nanopartículas autoensambladas formadas por dehidrofenilalanina dipéptido, se escogieron los nanotubos de fenilalanina- α,β -dehidrofenilalanina (F Δ F) por ser las partículas que presentaron una mayor capacidad de carga del fármaco.

Se comparó el fármaco cargado en los nanotubos de FDF con el fármaco libre, y se observó una mayor capacidad inhibitoria *in vitro* (IC_{50} 3.0 μ M frente a 13 μ M) para *P. falciparum* (cepa Indo), así como una mayor efectividad en ratones infectados con *P. berghei* [5].

2.2. Transportadores lipídicos nanoestructurados

El arteméter, un fármaco derivado de artemisina, es comúnmente utilizado junto a lumefantrina contra cepas multirresistentes. A pesar de su eficacia, la actual formulación presenta inconvenientes, como su fácil degradación en condiciones ácidas o la necesidad de tomar el fármaco junto a comidas grasas para su correcta absorción. Una formulación inyectada basada en el uso de transportadores lipídicos nanoestructurados (NLCs; del inglés *nanostructured lipid carriers*) cargados con arteméter y lumefantrina ha sido estudiada en ratones infectados con *P. berghei*. Las nanopartículas fueron generadas por homogeneización seguida de ultrasonificación. Tras 19 días, los ratones a los que se inyectaron ambos fármacos cargados en NLCs mostraron un $4\pm 3\%$ de parasitemia, mientras que aquellos a los que se les inyectaron los fármacos en una suspensión lipídica mostraron un $13\pm 4\%$. De esto se concluye que la reducción es mayor cuando los fármacos se cargan en las NLCs [6].

2.3. Nanopartículas derivadas de seroalbúmina

En otro estudio, se encapsuló arteméter en nanopartículas derivadas de seroalbúmina humana generadas mediante desolvatación. La seroalbúmina es uno de los nutrientes de cuya absorción depende el desarrollo de la fase intraeritrocítica del parásito. En un ensayo *in vitro*, estas nanopartículas fueron internalizadas por los eritrocitos infectados por *P. falciparum* a una mayor tasa que los eritrocitos sanos. Además, la dosis requerida para alcanzar la IC_{50} fue la mitad de la que requerida utilizando el fármaco sin encapsular. En ratones infectados con *P. berghei*, a los que se administró el fármaco por vía intravenosa, se alcanzó una mayor concentración del compuesto en los eritrocitos infectados cuando este estaba encapsulado [7].

3. VACUNA

A pesar de los esfuerzos realizados durante los últimos 30 años para desarrollar una vacuna contra la malaria, aún no se ha conseguido obtener una lo suficientemente efectiva. Esto se debe a varios factores. Uno de ellos es que *Plasmodium* presenta un ciclo de vida complejo que no expresa los mismos antígenos en todas sus etapas. Los antígenos son altamente polimórficos, y aquellos que se mantienen en todas las etapas del ciclo no son muy inmunogénicos. Las vacunas basadas en parásitos atenuados requieren de más esfuerzos logísticos que otros modelos, y por ahora no ofrecen protección cruzada frente distintas cepas [1].

El uso de vacunas que emplean nanopartículas, como las partículas similares a virus (VLPs, del inglés *virus-like particle*), las emulsiones estables o los liposomas, presentan una serie de ventajas a la hora de potenciar la inmunogenicidad de las vacunas de subunidades recombinantes. Por un lado, las nanopartículas pueden presen-

tar una elevada densidad de epítomos en su superficie, lo que favorece la activación de células B y la producción de anticuerpos específicos contra el patógeno. Por otro, estas partículas presentan un tamaño similar al de organismos patógenos, lo que parece facilitar el reconocimiento por parte de las células presentadoras de antígenos. Además de esto, permiten una liberación del antígeno prolongada y controlada, lo que favorece la inmunidad a largo plazo. Por último, es posible cargar nanopartículas con adyuvantes inmunoestimulatorios [8], como en el caso del sistema adyuvante AS01 mencionado más adelante.

3.1. RTS,S/A01

Actualmente, la vacuna que más ha avanzado en ensayos clínicos es la RTS,S/AS01. Se trata de una vacuna de subunidad recombinante contra la proteína *PFCS* de la fase esporozoítica de *P. falciparum*, que es la fase en la que el protozoo infecta al hospedador humano y es capaz de infectar hepatocitos [1]. En cuatro años de seguimiento, se ha visto que ofrece protección en niños con una eficacia del 28% con tres dosis y del 36% con cuatro dosis [9]. Su formulación actual cuenta con algunas características basadas en el campo de la nanobiología que han demostrado hacerla más efectiva que versiones anteriores [8]. Estas características son la fusión transcripcional de un antígeno derivado de la proteína *PFCS* del parásito al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), y el uso del sistema adyuvante AS01, basado en liposomas que contienen moléculas inmunoestimuladoras [10].

La coexpresión del gen recombinante junto a HBsAg da lugar a la formación de VLPs, estructuras estables generadas a raíz del autoensamblaje de proteínas de la cápsida vírica que presentan múltiples copias del antígeno en su superficie. Para su producción, los genes son expresados en células de *Saccharomyces cerevisiae* [10]. En la figura 2 se muestra un esquema del proceso de generación de estas VLPs.

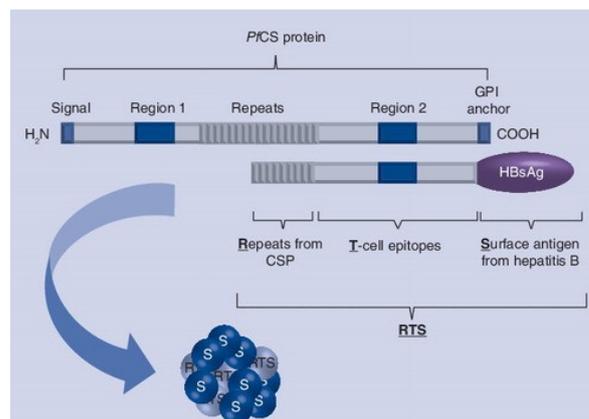


Fig. 1. Generación de RTS mediante la fusión de HBsAg y una sección de la proteína *PFCS*, que una vez coexpresada junto a HBsAg dará lugar a RTS,S. Imagen tomada de la referencia [10].

AS01 es el sistema adyuvante de RTS,S/AS01 y se basa en liposomas, nanovesículas que generalmente constan de una bicapa lipídica y un núcleo acuoso. En este caso, los liposomas contienen QS-21 y MPL. QS-21 es una sap-

onina extraída de *Quillaja saponaria* y MPL es un derivado de un lipopolisacárido de *Salmonella minnesota* R595, capaz de activar a los receptores TLR4. Esta combinación es capaz de activar la inmunidad innata, así como de potenciar las respuestas celular y humoral. Esto supone una importante diferencia respecto al uso de sales de aluminio, uno de los adyuvantes más frecuentemente utilizados. Estas sales, si bien activan la inmunidad humoral, no resultan eficaces a la hora de estimular la inmunidad mediada por células [10], [11].

3.2. Vacunas multi-antígeno

El inconveniente de las vacunas dirigidas contra una fase concreta del ciclo de vida de *Plasmodium*, como RTS,S/AS01, es que basta con que un parásito pase a la siguiente fase del ciclo de vida para que se produzca la infección. Además, tampoco previenen la transmisión [1]. Es por ello, que la vacuna ideal debería presentar determinantes antigénicos de distintas etapas del ciclo para maximizar su eficacia. Ya se encuentra en desarrollo una vacuna con estas características que emplea la tecnología en la que se basa RTS,S [12].

4. CONTROL DEL VECTOR

El control de la transmisión y del vector en sí se lleva generalmente a cabo mediante mosquiteros tratados con insecticidas, así como mediante rociado residual interdominiario [2]. La presión selectiva ejercida por los insecticidas ha dado lugar al desarrollo de resistencias por parte de *Anopheles* frente a los piretroides [13]. Esto implica la necesidad de usar insecticidas más costosos, una realidad que no es del todo viable en países con pocos recursos [2], de ahí el interés de estudiar alternativas al uso de insecticidas.

Una de estas alternativas son las nanopartículas de plata, en las que se ha observado actividad larvicida contra *Anopheles subpictus*, vector de malaria, así como contra *Culex quinquefasciatus* [14], [15]. Estas nanopartículas pueden ser sintetizadas utilizando extractos vegetales, de un modo simple, de bajo coste y reducido impacto ambiental en comparación con la síntesis basada en procesos físicos y químicos. La síntesis se basa en compuestos reductores presentes en las plantas, como vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos o polisacáridos [16].

5. DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIMALÁRICOS

Los quantum dots (QDs) son nanopartículas semiconductoras fluorescentes con una gran fotoestabilidad, un elevado desplazamiento de stokes y cuyo espectro de emisión varía en función de su tamaño. En un estudio se observó la capacidad que presentaban QDs de distintos tamaños y con diferentes recubrimientos para unirse a eritrocitos infectados por *P. falciparum* de forma específica. Se observó que los QDs catiónicos pegilados pueden hacer esto de forma eficiente y sin necesidad de ser conjugados a anticuerpos, aunque el mecanismo por el que se da esta especificidad aún no se conoce. Esto ha permitido el desarrollo de un método de cribado de fármacos

antimaláricos capaz de detectar de forma rápida la actividad plasmocida de los compuestos testados, haciendo uso del marcaje con QDs y de la detección y cuantificación con citometría de flujo.

Este método es más sensible que el de la lactato deshidrogenasa, ampliamente utilizado en cribado de fármacos antimaláricos. Para demostrarlo, se analizaron con ambos métodos eritrocitos infectados tratados con cloroquina y se compararon los resultados, observándose una sensibilidad un 50% mayor en el caso del ensayo basado en QDs [17].

6. CONCLUSIONES

Como se puede observar en lo expuesto en el artículo, la nanotecnología ofrece un amplio abanico de herramientas que pueden contribuir a combatir la malaria desde varios flancos, siendo muy prometedores los avances obtenidos en varios de ellos.

Por una parte, el uso de nanotransportadores podría ser clave en el desarrollo de nuevas formulaciones que mejoren la eficacia de los fármacos ya existentes, así como en la aplicación de compuestos que no son eficaces por sí solos pero podrían serlo acoplados a nanopartículas. Por otro lado, el desarrollo de vacunas como RTS,S/A01, así como las perspectivas de desarrollar otras basadas en la misma tecnología pero dirigidas contra múltiples antígenos será, probablemente, uno de los puntos clave en la lucha contra la epidemia en un futuro no muy lejano.

Además, la nanotecnología se encuentra entre las distintas herramientas existentes para la lucha contra organismos vectores de enfermedades. Por último, cabe destacar la aplicación de los quantum dots en el desarrollo de un método eficaz y sensible para cribar la eficacia de compuestos plasmocidas.

Sin embargo, no es solo la tecnología lo que ha de avanzar para poder acabar con esta enfermedad. Es esencial garantizar a las poblaciones afectadas el acceso a las medidas necesarias para prevenirla y tratarla.

REFERENCIAS

- [1] A. Cowman, J. Healer, D. Marapana and K. Marsh, "Malaria: Biology and Disease", Cell, vol. 167, no. 3, pp. 610-624, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055.
- [2] Web de la Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>
- [3] M. Thakkar and B. S., "Combating malaria with nanotechnology-based targeted and combinatorial drug delivery strategies", Drug Delivery and Translational Research, 2016, doi: 10.1007/s13346-016-0290-2.
- [4] N. Aditya, P. Vathsala, V. Vieira, R. Murthy and E. Souto, "Advances in nanomedicines for malaria treatment", Advances in Colloid and Interface Science, vol. 201-202, pp. 1-17, 2013, doi: 10.1016/j.cis.2013.10.014.
- [5] S. Alam, J. Panda, T. Mukherjee and V. Chauhan, "Short peptide based nanotubes capable of effective curcumin delivery for treating drug resistant malaria", Journal of Nanobiotechnology, vol. 14, no. 1, 2016, doi:10.1186/s12951-016-0179-8.
- [6] D. Parashar, A. N. P. and M. R. S. R., "Development of artemether

- and lumefantrine co-loaded nanostructured lipid carriers: physicochemical characterization and *in vivo* antimalarial activity", *Drug Delivery*, vol. 23, no. 1, pp. 123-129, 2014, doi:10.3109/10717544.2014.905883.
- [7] A. Sidhaye, K. Bhuran, S. Zambare, M. Abubaker, N. Nirmalan and K. Singh, "Bio-inspired artemether-loaded human serum albumin nanoparticles for effective control of malaria-infected erythrocytes", *Nanomedicine*, 2016, doi:10.2217/nnm-2016-0235.
- [8] Y. Wu, D. Narum, S. Fleury, G. Jennings and A. Yadava, "Particle-based platforms for malaria vaccines", *Vaccine*, vol. 33, no. 52, pp. 7518-7524, 2015, doi:10.1016/j.vaccine.2015.09.097.
- [9] B. Greenwood and O. Doumbo, "Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01", *The Lancet*, vol. 387, no. 10016, pp. 318-319, 2016, doi:10.1016/s0140-6736(15)00807-7.
- [10] J. Regules, J. Cummings and C. Ockenhouse, "The RTS,S vaccine candidate for malaria", *Expert Review of Vaccines*, vol. 10, no. 5, pp. 589-599, 2011, doi:10.1586/erv.11.57.
- [11] N. Garçon and M. Van Mechelen, "Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing Adjuvant Systems", *Expert Review of Vaccines*, vol. 10, no. 4, pp. 471-486, 2011, doi:10.1586/erv.11.29.
- [12] D. Heppner, K. Kester, C. Ockenhouse, N. Tornieporth, O. Ofori, J. Lyon, V. Stewart, P. Dubois, D. Lanar and U. Krzych, "Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research", *Vaccine*, vol. 23, no. 17-18, pp. 2243-2250, 2005, doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.142.
- [13] H. Ranson and N. Lissenden, "Insecticide Resistance in African Anopheles Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control", *Trends in Parasitology*, vol. 32, no. 3, pp. 187-196, 2016, doi:10.1016/j.pt.2015.11.010.
- [14] T. Santhoshkumar, A. Rahuman, G. Rajakumar, S. Marimuthu, A. Bagavan, C. Jayaseelan, A. Zahir, G. Elango and C. Kamaraj, "Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors", *Parasitology Research*, vol. 108, no. 3, pp. 693-702, 2010, doi:10.1007/s00436-010-2115-4.
- [15] G. Rajakumar and A. Abdul Rahuman, "Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors", *Acta Tropica*, vol. 118, no. 3, pp. 196-203, 2011, doi:10.1016/j.actatropica.2011.03.003.
- [16] R. Rajan, K. Chandran, S. Harper, S. Yun and P. Kalaichelvan, "Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials", *Industrial Crops and Products*, vol. 70, pp. 356-373, 2015, doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.015.
- [17] M. Ku, F. Dossin, Y. Choi, C. Moraes, J. Ryu, R. Song and L. Freitas-Junior, "Quantum dots: a new tool for anti-malarial drug assays", *Malaria Journal*, vol. 10, no. 1, p. 118, 2011, doi:10.1186/1475-2875-10-118.



Álvaro Quílez Borrachero recibió el título de Licenciado en Biología por la Universidad de Sevilla en 2013. Actualmente es estudiante del Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.

Nano-odontología: tratamiento de la caries dental

Alejandro Rubio Valle

Resumen— La caries dental, que causa la destrucción de tejidos dentarios, es una de las enfermedades con mayor incidencia en la actualidad. Debido al creciente interés en la aplicación dental de la nanotecnología, un nuevo campo de estudio, conocido como nano-odontología, ha emergido en la última década. La nano-odontología ofrece nuevas estrategias innovadoras con el objetivo de mejorar y optimizar el tratamiento convencional de dicha patología. Esta revisión, se centra, principalmente, en el potencial uso de nanopartículas, incorporadas en materiales de restauración dental, para el tratamiento de la caries dental.

Palabras Claves— Caries dental, Nano-odontología, Nanopartículas metálicas, Remineralización dental.

1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una gran área de estudio relacionada con la aplicación de estructuras en escala nanométrica, en al menos una dimensión[1].

Comparados con los materiales tradicionales, los nanomateriales presentan numerosas características mejoradas, como la tenacidad de fractura, rigidez o, resistencia a disolventes, entre otras. Las grandes diferencias entre las propiedades de las micropartículas y nanopartículas son explicadas en base al incremento exponencial de las interacciones interfaciales, así como su capacidad de compactación[2]. Esta revolución, en términos de dimensión y propiedades, abre nuevas perspectivas en el mundo de la odontología y ha provocado el nacimiento de un nuevo campo de investigación conocido como nano-odontología.

La caries dental es una de las enfermedades más extendidas por el mundo, siendo la principal causa de pérdida de piezas dentales en personas jóvenes. Es una patología multifactorial que implica una interacción entre los dientes, la saliva y la microbiota oral (factores del propio individuo) y la dieta (factor externo). En esta enfermedad se produce una destrucción de los tejidos dentarios, esmalte y dentina principalmente, como consecuencia de la desmineralización debida a los ácidos generados por la placa bacteriana[3]. En la actualidad, existen muchos alimentos y refrescos que contienen altos niveles de azúcar y ácido, incrementando la incidencia de esta enfermedad.

La odontología restaurativa moderna comienza con la invención de numerosos materiales como la amalgama, siendo este el material de relleno más implementado para el tratamiento de caries hasta finales de la década pasada. El cese de su uso se debió, principalmente, a la liberación de mercurio tras la fijación por este compuesto[4].

Nanopartículas de plata, óxido de zinc, fosfato de calcio, entre otras, se han incorporado en materiales de restauración como resinas compuestas, ionómeros de vidrio y sistemas adhesivos. En el presente artículo, se

discuten los avances de la nano-odontología para combatir la formación de la caries dental, centrándose en la capacidad antibacteriana y antifúngica de las nanopartículas y el uso de estas para estimular la remineralización dental.

2. PROPIEDADES ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE LAS NANOPARTICULAS

Los *biofilms* orales, especialmente los formados por la microbiota oral, en los cuales se incluye especies del género *Candida*, son muy difíciles de erradicar debido a su compleja estructura y fuerte unión. Además, la cavidad bucal es propensa a ser colonizada, ya que presenta diferentes tipos de superficies, como biomateriales o implantes dentales, asociados a una alta tasa de infecciones[5].

Aunque la desinfección de la cavidad bucal es de gran importancia, el número de desinfectantes disponibles en el mercado no es elevado. Por ello, las nanopartículas metálicas (como de plata o zinc) y los polímeros antimicrobianos han ganado especial relevancia en los últimos años, debido a sus notables propiedades antimicrobianas.

2.1 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata se han utilizado en una amplia gama de aplicaciones antimicrobianas tales como apósitos para heridas o recubrimientos de implantes, entre otras. Sin embargo, su modo de acción no ha sido aún completamente descrito.

Estas nanopartículas tienen la propiedad de anclarse en la pared celular del microorganismo y posteriormente atravesarla, causando así cambios estructurales en la integridad de la membrana celular. También se ha propuesto que la actividad microbicida puede ser debida a la liberación de iones de plata, que impiden la replicación del ADN bacteriano, ya que interactúan con los grupos tiol (-SH) expuestos de las enzimas involucradas en procesos celulares vitales, como la cadena de transporte de electrones (Figura 1)[6].

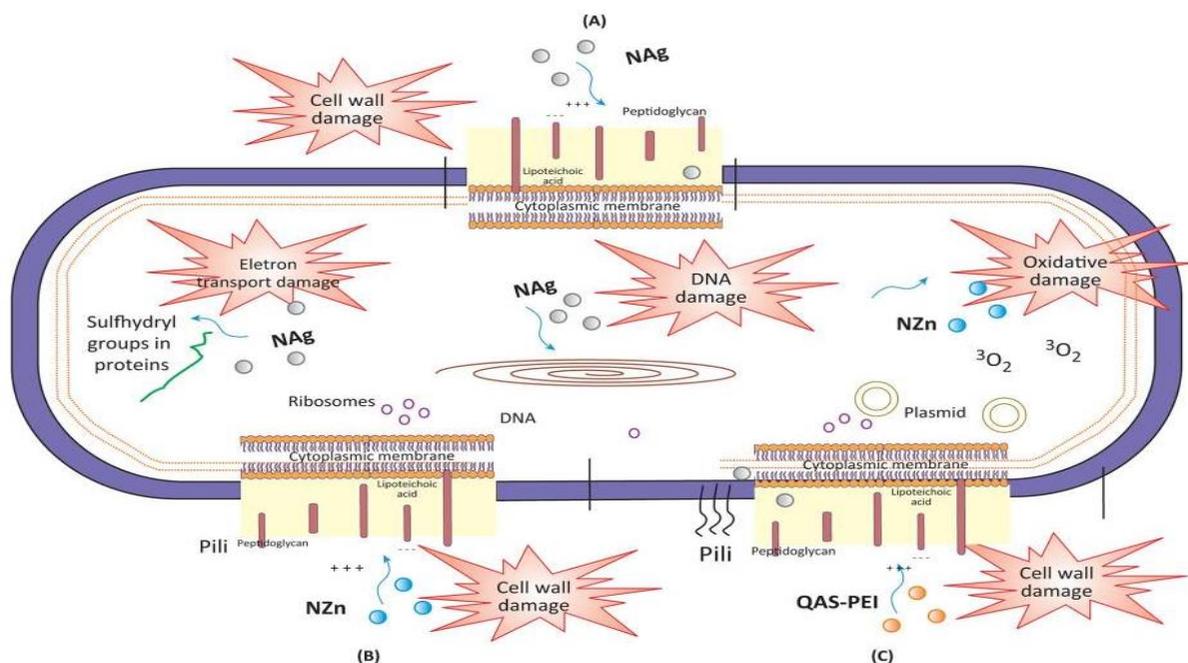


Fig 1. Representación esquemática de las dianas bacterianas de los diferentes agentes antibacterianos incorporados en materiales dentales: nanopartículas de plata (A), nanopartículas de óxido de zinc (B) y nanopartículas de polietileno imina de amonio cuaternario (QAS-PEI) (C)[7].

El efecto de las nanopartículas de plata en *biofilms* de *Candida sp.* fue descrito por primera vez en el año 2011. En este estudio, las nanopartículas fueron sintetizadas por la reducción de nitrato de plata con citrato sódico y posteriormente estabilizadas con amonio. Estas se aplicaron durante 24 h a células adheridas o *biofilms* de *C. albicans* y *C. glabrata*. Los resultados mostraron una reducción significativa en la biomasa total de las células adheridas y *biofilms*, aunque fue menos eficaz en este último grupo (Figura 2)[8].

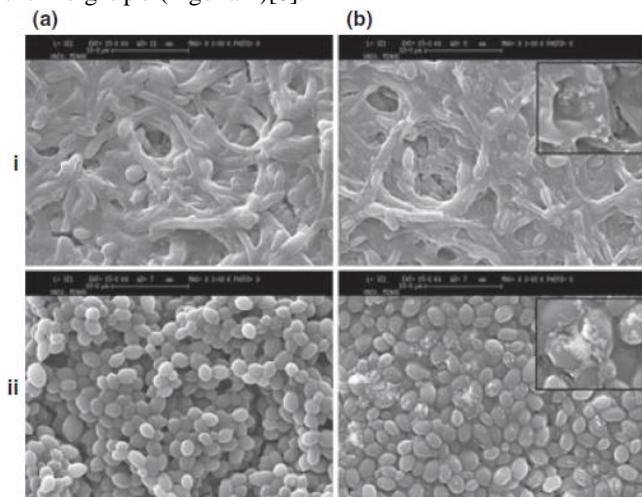


Fig 2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) que muestran la estructura de *biofilms* de *C. albicans* (i) y *C. glabrata* (ii) bajo distintas condiciones, control (a) o tratadas con nanopartículas de plata (b)[8].

En vista de la aplicación de nanopartículas de plata como desinfectante de dispositivos médicos contra la

proliferación de *biofilms* fúngicos, y considerando que la pérdida de la estabilidad química podría reducir su eficacia, se han llevado a cabo estudios para verificar si el aumento de la temperatura o el cambio de pH en una suspensión de estas nanopartículas afecta a dicha actividad anti-fúngica. Como resultado se obtuvo que ninguno de estos factores influye en el grado de efectividad de las mismas[9].

Por tanto, es posible considerar a este tipo de nanopartículas como una alternativa de desinfectante para combatir *biofilms* fúngicos. Sin embargo, se necesitan más estudios para elucidar el modo de acción, la citotoxicidad y la longevidad de las nanopartículas de plata.

2.2 Nanopartículas de óxido de zinc (ZnO)

El óxido de zinc (ZnO) ha mostrado efectos antibacterianos contra varios tipos de bacterias, incluyendo *Streptococcus mutans*. Las nanopartículas de ZnO presentan mayor efectividad que los métodos convencionales para combatir tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas. El mecanismo antibacteriano de estas nanopartículas se debe a la modificación de la actividad de la membrana celular y el incremento del estrés oxidativo que causa una inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 1). Una característica esencial de estas nanopartículas es la selectiva toxicidad contra bacterias, este hecho impide que las células humanas sean afectadas[10].

Otra acción antimicrobiana de las nanopartículas de ZnO es la lixiviación de Zn^{2+} en el medio de crecimiento, disminuyendo la formación de *biofilms* por la inhibición del transporte activo y del metabolismo de azúcares. Sin

embargo, la eficacia antibacteriana es menor cuando se compara con la obtenida por materiales cargados con nanopartículas de plata. Además, aún se desconoce la fracción óptima que puede incorporarse en compuestos dentales sin afectar las propiedades mecánicas de estos[10].

2.3 Nanopartículas de polietilenimina de amonio cuaternario (QAS-PEI)

Las nanopartículas de polietilenimina de amonio cuaternario (QAS-PEI) presentan la ventaja de que el agente antibacteriano se copolimeriza con la resina formando un enlace covalente con la red polimérica y, por lo tanto, se inmoviliza en el compuesto impidiendo su liberación o pérdida en el tiempo. Por ello, este método proporciona una capacidad antibacteriana duradera y permanente al material dental sin afectar significativamente el equilibrio biológico en la cavidad oral[11].

El mecanismo antimicrobiano de estas nanopartículas aún no se conoce completamente. Las QAS-PEI causan la lisis bacteriana por la unión a la membrana celular como resultado de los agentes policatiónicos. Estos agentes provocan la absorción de los polímeros cargados positivamente sobre las superficies bacterianas cargadas negativamente (Figura 1). Se están desarrollando nuevos monómeros con QAS-PEI para optimizar las propiedades anticaries de materiales convencionales[11].

3. USO DE NANOPARTÍCULAS PARA LA REMINERALIZACIÓN DENTAL

Biomimetizar la remineralización del esmalte es una de las principales vías de investigación dentro de la nanodontología, ya que esta propiedad podría utilizarse como una alternativa para materiales dentales de restauración. Por tanto, los materiales anticaries deben presentar la propiedad de inducir y modular la actividad biológica de mineralización dental. Actualmente, se está investigando la incorporación de diversos tipos de nanopartículas en estos materiales[12].

Teniendo en cuenta las aplicaciones de los nanomateriales en la restauración dental, estos se pueden agrupar en nanoadhesivos y nanocompositos. Los materiales nanoadhesivos consisten en soluciones con nanopartículas dispersables que impiden aglomeraciones. En cambio, los nanocompositos son empleados para prevenir la formación de caries secundarias y evitar fracturas de las zonas restauradas[13].

3.1 Nanopartículas de fosfato de calcio

Se han desarrollado nanopartículas de fosfato de calcio (Figura 3) para liberar iones de calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}), aumentando el contenido de minerales en lesiones inducidas por caries. Estos iones pueden difundir fuera de la resina pre-saturada para crear una elevada concentración local de superficie, estimulando así la precipitación y la deposición en las estructuras dentales como mineral de apatita[14]. La presencia de estas nanopartículas en rellenos dentales es un método que se

está comenzando a emplear en clínica.

El enriquecimiento de resinas nanocompuestas con rellenos de refuerzo y nanopartículas de fosfato de calcio puede promover la remineralización sin pérdida de las propiedades mecánicas de la resistencia a la flexión. Además, se han realizados estudios combinando estos nanomateriales con nanopartículas de plata creando compuestos con actividad antibacteriana y anticaries[14].

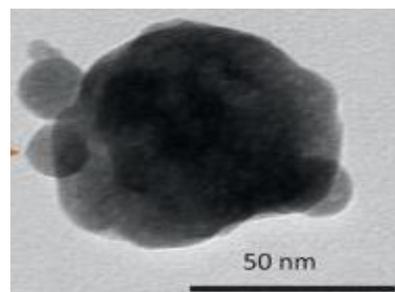


Fig 3. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de fosfato de calcio[15].

3.2 Nanopartículas de fluoruro de calcio (Ca_2F).

Desde que se descubrió las propiedades anticaries y de remineralización dental del fluoruro se han llevado a cabo numerosos estudios para su incorporación en materiales de restauración dental. El principal problema de este compuesto, aparte de su elevada toxicidad, es la poca capacidad mecánica que aporta a los materiales dentales.

La adición de nanopartículas de Ca_2F a compositos mejora las propiedades mecánicas, así como la liberación de fluoruro. Sin embargo, estas nanopartículas siguen en desarrollo debido a su baja eficacia de incorporación[15].

3.3 Nanohidroxiapatita y nanofluorohidroxiapatita

Estos nanocompuestos son los principales candidatos para reemplazar aquellas zonas de la dentina deterioradas, debido a su compatibilidad biológica y elevada tasa de remineralización.

Un estudio demostró que el anclaje de nanohidroxiapatita en estructuras dendrímicas con alendronato mejora la capacidad de remineralización, llevada a cabo por estos nanomateriales, del esmalte (Figura 4)[16]. Sin embargo, aún no se ha logrado optimizar el proceso de fabricación de los mismos, excediendo el tiempo de síntesis clínicamente adecuado.

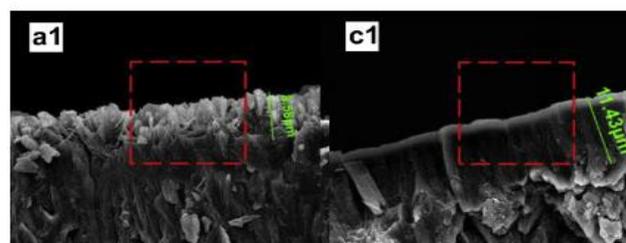


Fig 4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) que muestran una sección transversal del esmalte dental sin tratamiento (a1) y con ALN-PAMAM-COOH (dendrímico de poliaminoamida con alendronato) (c1), después de ser mantenidas en saliva artificial durante cuatro semanas[16].

4. CONCLUSIONES

En el presente artículo se han propuesto varias aplicaciones odontológicas de nanopartículas que muestran claras ventajas en comparación con los compuestos convencionales, evidenciando el gran potencial de las mismas. No obstante, la aplicación clínica aún no es viable, en la mayoría de los ejemplos, para la terapia de caries dental. Este hecho se debe al escaso conocimiento de la seguridad y modo de acción de los nanomateriales en el campo de la caries dental.

Los estudios sobre la producción, caracterización y aplicación de los nanomateriales están evolucionando rápidamente en las diferentes áreas de la nano-odontología. Sin embargo, existe la necesidad de evaluar el comportamiento de estas nanoestructuras en la cavidad bucal, porque la mayor parte de los análisis de toxicidad de estos materiales se restringe a datos *in vitro*. Por lo tanto, los nanocompositos requieren aún una profunda investigación *in vivo* antes de su aplicación. Además, se requieren más estudios clínicos para la evaluación a largo plazo de los nanomateriales destacados en esta revisión con el fin de comprender mejor sus mecanismos de acción.

REFERENCIAS

- [1] Z. Huang, H. Chen, Z. Chen, and M. C. Roco, "International nanotechnology development in 2003: Country, institution, and technology field analysis based on USPTO patent database," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 325–354, Aug. 2004.
- [2] M. Patil, D. S. Mehta, and S. Guvva, "Future impact of nanotechnology on medicine and dentistry," *J. Indian Soc. Periodontol.*, vol. 12, no. 2, pp. 34–40, May 2008.
- [3] C. Hannig, S. Basche, T. Burghardt, A. Al-Ahmad, and M. Hannig, "Influence of a mouthwash containing hydroxyapatite microclusters on bacterial adherence *in situ*," *Clin. Oral Investig.*, vol. 17, no. 3, pp. 805–814, Apr. 2013.
- [4] F.-X. Reichl, S. Simon, M. Esters, M. Seiss, K. Kehe, N. Kleinsasser, and R. Hickel, "Cytotoxicity of dental composite (co)monomers and the amalgam component Hg₂⁺ in human gingival fibroblasts," *Arch. Toxicol.*, vol. 80, no. 8, pp. 465–472, Aug. 2006.
- [5] B. J. Coco, J. Bagg, L. J. Cross, A. Jose, J. Cross, and G. Ramage, "Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis," *Oral Microbiol. Immunol.*, vol. 23, no. 5, pp. 377–383, Oct. 2008.
- [6] J. J.-Y. Peng, M. G. Botelho, and J. P. Matinlinna, "Silver compounds used in dentistry for caries management: A review," *J. Dent.*, vol. 40, no. 7, pp. 531–541, Jul. 2012.
- [7] S. Imazato, J. Chen, S. Ma, N. Izutani, and F. Li, "Antibacterial resin monomers based on quaternary ammonium and their benefits in restorative dentistry," *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 48, no. 2, pp. 115–125, 2012.
- [8] D. R. Monteiro, S. Silva, M. Negri, L. F. Gorup, E. R. de Camargo, R. Oliveira, D. B. Barbosa, and M. Henriques, "Silver colloidal nanoparticles: Effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 114, no. 4, pp. 1175–1183, 2013.
- [9] A. Besinis, T. De Peralta, and R. D. Handy, "Inhibition of biofilm formation and antibacterial properties of a silver nano-coating on human dentine," *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 7, pp. 1–10, Aug. 2013.
- [10] S. Tavassoli Hojati, H. Alaghemand, F. Hamze, F. Ahmadian Babaki, R. Rajab-Nia, M. B. Rezvani, M. Kaviani, and M. Atai, "Antibacterial, physical and mechanical properties of flowable resin composites containing zinc oxide nanoparticles," *Dent. Mater.*, vol. 29, no. 5, pp. 495–505, May 2013.
- [11] J. Barros, M. G. Silva, I. N. Rôças, L. S. Gonçalves, F. F. Alves, M. A. Lopes, I. Pina-Vaz, and J. F. Siqueira, "Antibiofilm Effects of Endodontic Sealers Containing Quaternary Ammonium Polyethylenimine Nanoparticles," *J. Endod.*, vol. 40, no. 8, pp. 1167–1171, Aug. 2014.
- [12] G. C. Padovani, V. P. Feitosa, S. Sauro, F. R. Tay, G. Durán, A. J. Paula, and N. Durán, "Advances in Dental Materials through Nanotechnology: Facts, Perspectives and Toxicological Aspects," *Trends Biotechnol.*, vol. 33, no. 11, pp. 621–636, 2015.
- [13] H. H. K. Xu, M. D. Weir, L. Sun, J. L. Moreau, S. Takagi, L. C. Chow, and J. M. Antonucci, "Strong Nanocomposites with Ca, PO₄, and F Release for Caries Inhibition," *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 1, pp. 19–28, Jan. 2010.
- [14] Z. Chen, S. Cao, H. Wang, Y. Li, A. Kishen, X. Deng, X. Yang, Y. Wang, C. Cong, H. Wang, and X. Zhang, "Biomimetic Remineralization of Demineralized Dentine Using Scaffold of CMC/ ACP Nanocomplexes in an In Vitro Tooth Model of Deep Caries," *PLoS One*, vol. 10, no. 1, p. e0116553, Jan. 2015.
- [15] L. Cheng, M. D. Weir, H. H. K. Xu, A. M. Kraigsley, N. J. Lin, S. Lin-Gibson, and X. Zhou, "Antibacterial and physical properties of calcium-phosphate and calcium-fluoride nanocomposites with chlorhexidine," *Dent. Mater.*, vol. 28, no. 5, pp. 573–583, May 2012.
- [16] D. Wu, J. Yang, J. Li, L. Chen, B. Tang, X. Chen, W. Wu, and J. Li, "Hydroxyapatite-anchored dendrimer for *in situ* remineralization of human tooth enamel," *Biomaterials*, vol. 34, no. 21, pp. 5036–5047, 2013.



Alejandro Rubio Valle recibió el título de Graduado en Biología por la Universidad de Sevilla en 2016. Además, obtuvo el diploma de Análisis Bioinformático por la Universidad de Pablo de Olavide ese mismo año. Actualmente es estudiante del Máster en Biotecnología sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide.

Técnicas analíticas de alta resolución en la identificación y estudio de la degradación de los amarillos de cadmio y cromo en obras de las Primeras Vanguardias (1900-1940)

M^a Teresa Pastor Valls

Resumen—El presente artículo trata del uso y combinación de diferentes técnicas analíticas de alta sensibilidad y especificidad (radiación de sincrotrón: μ XANES, μ -XRD, SR- μ XRF, SR-FTIR; TOF-SIMS, SERS, etc.), en la identificación y estudio de los mecanismos de degradación de pigmentos inorgánicos de color amarillo cromo y amarillo cadmio en obras de Van Gogh y Matisse pertenecientes a las Primeras Vanguardias (post-impresionismo-expresionismo y fauvismo).

Palabras Claves— Pigmentos, amarillo de cadmio, amarillo de cromo, degradación, identificación, conservación, técnicas analíticas.



1. INTRODUCCIÓN

Los cambios sociales, políticos, económicos y culturales producidos a partir de la Revolución Industrial (1750-1840), transmutarían todos los aspectos de la vida y producción artística. El trabajo artesano fue reemplazado por la industria y la manufactura, se produce la mecanización de las industrias textiles y el desarrollo de la industria del hierro, el incremento de la productividad y la reducción de costes, así como la expansión del comercio, etc. Esto favorece la introducción en el mercado de los nuevos pigmentos de síntesis y de las telas industriales, que pronto comenzaron a utilizar los pintores impresionistas [1].

En el ámbito artístico, este proceso tomó forma definitivamente con la experimentación de las Vanguardias de finales del XIX y principios del XX, en el contexto de la denominada Segunda Revolución Industrial (1870-1914). Revolución en la que se produce el crecimiento de la industria química, siderúrgica (acero), eléctrica y petrolífera, unida a la producción en masa y al desarrollo de los bienes de consumo, finalizando con el estallido de la Primera Guerra Mundial (1914-1918), a partir de la cual sobreviene un período de entreguerras con grandes problemas políticos y sociales, la crisis económica de 1919-1939, el ascenso del fascismo entre otros, y la Guerra Civil Española (1936-1939), en el contexto nacional, etc.[2]

A la par que se produce un abandono de cánones y tratados o la publicación de manifiestos, se produce la incorporación de los nuevos materiales pictóricos y con ello la experimentación. La paleta de color tradicional cambia en favor de los nuevos pigmentos y colorantes gracias al desarrollo de la investigación química y mineralógica en la primera mitad del siglo XIX, la cual continúa en las décadas siguientes [3], revolucionando el lenguaje artísti-

co tradicional.

Algunos pigmentos inorgánicos producidos a raíz de estos descubrimientos son los blancos de bario, zinc o titanio; los amarillos de bario, cromo, zinc, cadmio o de hierro (amarillo de Marte); los azules de cobalto, ultramar, cerúleo o de manganeso; el naranja de cadmio; los rojos de Cadmio y Marte; el verde óxido de cromo y Viridian; los violetas de cobalto y de manganeso o el negro de Marte [4] [5]. El desarrollo de la química orgánica posterior produjo otros colorantes a través de procesos de lavado perfeccionados poniendo a disposición de los artistas nuevos colores intensos y atractivos como los rosa, púrpuras o rojos [6], así como la producción de colorantes orgánicos con clases químicas como los monoazo, disazo, ftalocianina, quinacridona, etc.[7]

Pronto surgieron problemas de producción y abastecimiento, se producían cambios en las formulaciones a causa de la degradación temprana o para abaratar costes, de estos productos que permanecían poco tiempo en el mercado siendo reemplazados por otros más estables y económicos y a veces se adulteraban. Lo mismo ocurre con aglutinantes como los aceites para el óleo, incorporándose aditivos e ingredientes según cada fabricante.

De ahí que muchas obras sufrieran cambios de color en un plazo de tiempo relativamente corto a comparación con obras tradicionales. Algunas alteraciones presentadas, tales como virajes de color, decoloración, aparición de craquelados, pulverulencia, migración de aditivos, chorreado de colores que no secan o la formación de jabones metálicos guardan una estrecha relación con la interrelación de factores de orden interno como la composición química y la influencia de las condiciones ambiental que llegan a impactar visualmente. Dichos problemas de conservación han motivado el desarrollo de investigaciones en obras maestras pertenecientes al impresionismo, postimpresionismo, expresionismo, fauvismo, etc., a fin

de comprender los mecanismos de degradación y diseñar estrategias de conservación.

2. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN LA IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LA PALETA DE COLOR DE LAS PRIMERAS VANGUARDIAS

En general las técnicas analíticas aplicadas en la identificación de la paleta de color y su degradación en obras de las Primeras Vanguardias, suelen apoyarse en técnicas complementarias, así como en fuentes históricas, recetarios, libros de patentes y muestras de referencia. Tanto la obtención de los patrones obtenidos de compuestos identificados como la extracción y preparación de las muestras, junto a la interpretación de los resultados implican procesos de elevada complejidad.

En la identificación de pigmentos inorgánicos suelen emplearse técnicas no invasivas mediante equipos portátiles como la espectroscopía de fluorescencia de rayos X o la espectroscopía visible [8], junto al análisis de micromuestras con SEM-EDX. No obstante, la complejidad de identificar y conocer la distribución de los complejos de degradación en las muestras, así como los problemas de interpretación a causa de la interferencia de otros pigmentos, aditivos, cargas, aglutinantes y contaminantes, ha favorecido la aplicación de otras técnicas analíticas más precisas en el ámbito del diagnóstico del estado de conservación del patrimonio cultural.

La **combinación de técnicas de radiación de sincrotrón** como la Espectroscopía de rayos X de absorción cercana a la estructura del borde (μ XANES), micro difracción de rayos X (μ -XRD), micro fluorescencia de rayos X SR- μ XRF combinadas con SR-FTIR y SEM-EDX, se han empleado con éxito en la caracterización del proceso de degradación de los amarillos de cromo y cadmio en obras de Van Gogh [9], [10] y Matisse [11]. Pues, el sincrotrón permite la caracterización de materiales con un alto poder de resolución debido a la alta intensidad y al pequeño tamaño de haz de rayos X emitido con gran potencia.

Las técnicas anteriores se han combinado con la **espectrometría de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo (TOF-SIMS)** en la investigación llevada a cabo por Voras et al., en el lienzo de Matisse *Le Bonheur de vivre* (Fig. 2) en la que se detectan y captan especies moleculares y elementales relacionadas con el sulfuro de cadmio del pigmento, la alteración del aglutinante con variación de cantidades de ácidos grasos y afectaciones a causa de intervenciones de restauración (limpiezas y barnizado) [12]. Esta técnica es capaz de proporcionar información elemental, estadística química y molecular de superficies, captando imágenes de compuestos orgánicos e inorgánicos en una sección de pintura a nivel micrométrico con resolución espacial.

Además se ha aplicado con éxito la **espectroscopía Raman no invasiva** mediante equipos portátiles en pinturas de Van Gogh (Fig. 1), con resultados comparados con micro-Raman, resultando una técnica muy fiable y sensible en la identificación y mapeado de diferentes amarillos de cromo en superficie revelando el uso combinado de amarillos (cromatos y sulfatos) y naranja de cromo [13].

Para concluir este apartado, señalar que en la identificación de lacas orgánicas suele ser común el uso de la espectroscopía UV-VIS y cromatografía de gases HPLC, si bien las limitaciones a causa de interferencias o los límites de aplicación han favorecido el desarrollo de estudios con **espectroscopía Raman amplificada en superficie (SERS)** aplicados a la caracterización de lacas rojas, empleadas por artistas como Manet, Pissarro, Renoir, Monet, Gauguin. Sin duda una técnica poderosa para la detección selectiva y ultrasensible de moléculas orgánicas absorbidas en nanoestructuras de metales nobles, la cual permite el uso de muestras muy pequeñas. En este sentido el estudio de Pozzi *et Al.* revela el uso por Van Gogh de lacas de cochinilla, rubia, a veces con adición de eosina (a partir de 1888) y puntualmente de palo de Brasil [14].

3. AMARILLOS DE CADMIO Y CROMO: DEGRADACIÓN

En este apartado se exponen de forma breve algunos de los resultados obtenidos en los últimos años en cuanto a la degradación de estos pigmentos de color amarillo en obras de Van Gogh y Matisse (ver Fig. 1 y 2).



Fig. 1. *Sunflowers*, 1889 de Van Gogh (vangoghmuseum Amsterdam) y Fig. 2. *Le Bonheur de vivre*, 1906, (The Barnes Foundation).

3.1. Amarillo de Cadmio (CdS)

La alteración de este pigmento comercializado de forma extendida a partir de 1846, es visible ópticamente por su debilitamiento, decoloración, pulverulencia, descamación, levantamiento, agrietado y desconchado. La aplicación combinada de técnicas de sincrotrón arroja luz sobre las causas de la aparición de estas alteraciones con la identificación, localización y análisis de la influencia de los carbonatos, sulfatos y sulfuro de cadmio hallados en secciones alteradas de obras de Matisse (The Barnes Foundation) [15]. La distribución de varios compuestos de cadmio confirma que los carbonatos y sulfatos son productos de degradación en *The Joy of Live* y *Flower Piece* (Fig. 2), mientras que en *Flower Piece*, los carbonatos de cadmio parecen ser reactivos iniciadores residuales de un proceso indirecto de síntesis húmedo del pigmento.

La fotodegradación (UV-visible) parece estar detrás de la alta solubilización del pigmento capaz de migrar a través de los estratos, en la que la exposición a niveles altos de humedad parece junto a la anterior ser responsable del inicio de su debilitamiento y decoloración (posible formación de ácido sulfúrico). Además se ha identificado la hidrólisis ácida del aglutinante y la influencia del barniz [16], [17].

3.1. Amarillo de Cromo (PbCrO₄)

El amarillo de París descubierto en 1797/1804, fue utilizado por Turner, Constable, Pissarro, Cézanne, Monet, Van Gogh, Seurat y Ensor. Con un tono que va del limón al naranja, presenta una distinta estabilidad que depende de su composición (PbCrO₄ y PbCr_{1-x}S_xO₄) y estructura cristalina. Este pierde intensidad y adquiere un tono marrón verdoso al exponerlo tanto a la luz solar como a contaminantes ambientales y/o gases atmosféricos (SO₂ y H₂S) [18]. Los análisis realizados sobre muestras de Van Gogh descubren mecanismos de degradación de reducción del Cr (IV) a Cr (III) y (II), favorecidos en su forma ortorrómbica (PbCr_{1-x}S_xO₄), junto a la influencia de aniones sulfato. Además de detectar el uso de distintos tipos de pigmento incluyendo las formas más inestables se ha descubierto que el oscurecimiento de algunas zonas de los Girasoles (fig. 1) (PbCrO₄, PbCrO₄.xPbCr₄ o PbCrO₄.xPbO), está causado por la reducción del PbCrO₄ a Cr₂O₃.2H₂O (verde viridian) y presencia de compuestos del Cr (III) [19].

5. CONCLUSIONES

La aplicación de las técnicas de análisis de alta sensibilidad anteriormente referenciadas en el ámbito del diagnóstico del estado de conservación del patrimonio cultural, abre un camino de posibilidades para comprender los problemas de conservación de obras de arte moderno y contemporáneo. Aunque todavía inaccesibles para muchas instituciones, su aplicación en obras de arte maestras han permitido realizar estudios de alta resolución espacial e identificación precisa de productos de degradación de pigmentos y aglutinantes en zonas muy concretas de las obras. Dichos estudios tienen por tanto una gran relevancia, siendo de aplicación en otras obras, a la par que constituyen una importante base documental para comprender las técnicas e intencionalidad artística de autores de los siglos XIX-XX, evaluar los resultados a largo plazo de los tratamientos de restauración, diseñar tratamientos y establecer estrategias adecuadas para el almacenaje y exhibición.

REFERENCIAS

- [1] C. Alvear Acevedo, *El mundo contemporáneo*. México, Jus, pp. 42-44, 1997.
- [2] H. Kinder, W. Hilgemann, *Atlas Histórico Mundial II. De la Revolución Francesa a nuestros días*, Madrid: Istmo, p. 201, 1992.
- [3] F. Pozzi, K. Van den Berg, I. Fiedler y F. Casadio, "A systematic analysis of red lake pigments in French Impressionist and Post-Impressionist paintings by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)", *Journal of Raman Spectroscopy*, (wileyonlinelibrary.com: DOI 10.1002/jrs.4483), S/L: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1119-1126, 2014.
- [4] T. Learner, *Analysis of Modern Paints*. Los Ángeles, GCI, pp. 25-26, 2004.
- [5] D. Oltrogge, *The Use of VIS Spectroscopy in Non Destructive Paint Analysis. Potential and Limits of the Method for 19th and Early-20th-Century Paintings. On the Results of the Investigations of Impressionist and Postimpressionist Paintings in the Collection of the Wallraf-Richartz-Museum & Foundation Corboud Cologne*. For-

schungsprojekt Maltechnik des Impressionismus und Postimpressionismus. Online edition. www.museenkoeln.de/impressionismus, Köln, pp. 1-38, 2008.

- [6] F. Pozzi *et Al*, *Op. cit.*, pp. 1119-1126.
- [7] T. Learner, *Op. cit.*, pp. 25-26.
- [8] Oltrogge, *Op. cit.*, pp. 1-5.
- [9] L. Monico, G. Van der Snickt, K. Janssens, W. De Nolf, C. Miliani, J. Dik, M. Radepon, E. Hendriks, M. Geldof y M. Cotte, "Degradation Process of Lead Chromate in Paintings by Vincent van Gogh Studied by Means of Synchrotron X-ray Spectromicroscopy and Related Methods. 2. Original Paint Layer Samples", *Analytical chemistry*, (dx.doi.org/10.1021/ac1025122), S/L: ACS Publications, pp. 1224-1231, 2011.
- [10] G. Van der Snickt, K. Janssens, J. Dik, W. De Nolf, F. Vanmeert, J. Jaroszewicz, M. Cotte, G. Falkenberg, L. Van der Loeff, "Combined use of Synchrotron Radiation Based Micro-X-ray Fluorescence, Micro-X-ray Diffraction, Micro-X-ray Absorption Near-Edge, and Micro-Fourier Transform Infrared Spectroscopies for Revealing an Alternative Degradation Pathway of the Pigment Cadmium Yellow in a Painting by Van Gogh". *Analytical Chemistry*, (dx.doi.org/10.1021/ac3015627), S/L: ACS Publications, pp. 10221-10228, 2012.
- [11] E. Pouyet, M. Cotte, B. Fayard, M. Salomé, F. Meirer, A. Mehta, E.S. Uffelman, A. Hull, F. Vanmeert, J. Kieffer, M. Burghammer, K. Janssens, F. Sette, J. Mass, "2D X-ray and FTIR micro-analysis of the degradation of cadmium yellow pigment in paintings of Henri Matisse", *Applied Physics A*, (DOI 10.1007/s00339-015-9239-4), Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 967-980, 2015.
- [12] Z. Voras, K. deGhetaldi, M. Wiggins, B. Buckley, B. Baade, J. Mass y T. Beebe, "TOF-SIMS Imaging of Molecular Level Alteration Mechanisms in Le Bonheur de vivre by Henri Matisse", *Applied Physics A*, (DOI 10.1007/s00339-015-9508-2), Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1015-1030, 2015.
- [13] L. Monico, K. Janssens, E. Hendriks, B. Brunetti y C. Miliani, "Raman study of different crystalline forms of PbCrO₄ and PbCr_{1-x}S_xO₄ solid solutions for the noninvasive identification of chrome yellows in paintings: a focus on works by Vincent van Gogh", *Journal of Raman Spectroscopy*, DOI: 10.1007/s00339-015-9239-4, S/L: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 1034-1045, 2014.
- [14] F. Pozzi *et Al*, *Op. cit.*, pp. 1119-1126.
- [15] E. Pouyet, *Op. cit.*, pp. 967-969.
- [16] Z. Voras, *Op. cit.*, pp. 1015-1030.
- [17] G. Van der Snickt, *Op. cit.*, pp. 10221-10228.
- [18] L. Monico *et Al*, *Op. cit.*, 1224-1225, 1230-31.
- [19] L. Monico *et Al*, *Op. cit.*, p. 1035.

Fig. 1: Van Gogh Museum Amsterdam. Web [On line]. <www.vangoghmuseum.nl/es>. [Consulta: 11/02/17] y Fig. 2: The Barnes Foundation. Web [On line]. <www.barnesfoundation.org/collections/art-collection/object/7199/le-bonheur-de-vivre-also-called-the-joy-of-life>. [Consulta: 11/02/17]



Mª Teresa Pastor Valls alumna del Máster Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico. Es doctora por la UPV en Conservación y Restauración de Patrimonio Histórico, Título superior en Conservación y Restauración de Bienes Culturales Especialidad Pintura y Licenciada en Humanidades. Trabaja como técnico superior en conservación restauración de arte contemporáneo en el Museu d'Art Contemporani Vicente Aguilera Cerni de Vilafamés y colabora con la Subdirección General del Instituto Valenciano de Conservación y Restauración IVC+R, CulturArts GVA.

La Fluorescencia visible inducida por radiación ultravioleta, técnica y aplicaciones en la Fotografía Histórica

Pía Monteverde-Puig

Resumen— La fluorescencia inducida por radiación ultravioleta cuenta con un amplia historia de uso y caracterización de materiales, que la han convertido en una herramienta de inspección cotidiana en la disciplina de la conservación. Su técnica de captura y aplicaciones en la conservación de fotografías tiene interesantes aristas aún por investigar.

Palabras Claves— fluorescencia visible inducida por radiación ultravioleta, UV, FUV, diagnóstico, fotografía.

1. INTRODUCCIÓN

La fluorescencia visible inducida por radiación ultravioleta, FUV, es una técnica de análisis no destructivo muy utilizada en el diagnóstico del estado de conservación del patrimonio histórico, con antecedentes de uso ya previos a 1929, como se puede leer en “Marble Sculpture and Ultraviolet Ray” [1] y donde más tarde, el mismo autor, amplió la aplicación de este análisis por “rayos ultravioletas” a otros materiales, como alabastro, piedra caliza, arenisca, piedras semi y preciosas, marfil, huesos, cerámicas, textiles, pinturas, dibujos, impresiones en papel, metal, vidrio, etc, publicando sus resultados en *Ultra-Violet Rays and Their Use in the Examination of Works of Arts*, en 1931. Es interesante ver en esta publicación fotografías coloreadas con la apariencia de los objetos bajo la radiación ultravioleta. Figura 1.

Las razones del uso tan frecuente de FUV en el diagnóstico de obras, radica por un lado, en la accesibilidad de los equipos y por otro, la amplia gama de materiales y alteraciones que bajo la radiación UV manifiestan un cierto comportamiento relativamente caracterizado; pero aunque la fluorescencia visible por radiación ultravioleta responde ciertas preguntas relacionadas con el objeto de estudio, el rango de materiales utilizados en el patrimonio es tan amplio que requiere de otros análisis complementarios que puedan dar con una respuesta acabada.

Cabe señalar que aunque la absorción de radiación UV de los materiales durante la examinación es muy pequeña, tiene efectos dañinos sobre los materiales de origen orgánico, por lo que su uso debe ser limitado a tiempos cortos de exposición. Además, deben tomarse medidas de seguridad cuando se trabaja con esta radiación como uso de gafas protectoras y en lo posible utilizar mascarar que cubran la totalidad del rostro, tanto como bloqueador solar para la piel y vestimenta opaca a la radiación que cubra la mayor parte del cuerpo y que no contamine la escena con luz parásita.



Fig. 1. Fotografía coloreada de un plato italiano bajo la luz ultravioleta.

2. FLUORESCENCIA INDUCIDA POR RADIACIÓN UV

2.1. Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta, es una forma de radiación electromagnética comprendida entre los 10 nm y 400 nm, donde sus niveles energéticos son menores a los rayos X y mayor que la luz visible. Figura 2.

La región de su espectro es dividida en cuatro porciones:

-UVA, longitud de onda larga y esta comprendida entre los 320 nm y 400 nm. Las lámparas de Wood o luz negra se encuentra dentro de este rango y son las más utilizadas en conservación [3]. En general su uso es en los 365 nm y fueron conocidas como “low frequency (LF)” [2].

-UVB, longitud de onda media, comprendida entre los 280 nm y 320 nm.

-UVC, longitud de onda corta, comprendida entre los 180 nm y 280 nm. Algunas lámparas de inspección por UV, tiene dos opciones de longitud de onda, de 365 nm y de 254 nm, aunque supone un menor nivel de calidad en el estímulo por ser un lámpara mixta. También fueron conocidas como “high frequency” (HF) [2].

-UV de vacío, comprende entre los 10 y 180 nm pero no esta presente en el aire pues es absorbida por el oxígeno [3].

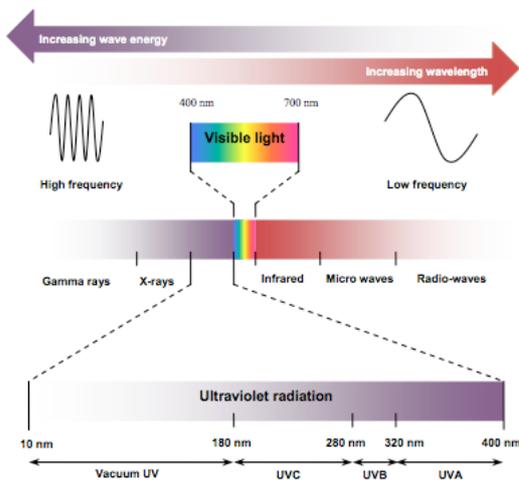


Fig. 2. Espectro electromagnético [2].

2.2. Fluorescencia

La fluorescencia, es un tipo de luminiscencia que es posible de observar en el rango del visible y que persiste en el tiempo sólo mientras el material es expuesto a la radiación UV, en esto radica su principal diferencia con la fosforescencia.

Este fenómeno físico, consiste en el salto cuántico de aquellos electrones que absorbieron la radiación UV, reubicándose en niveles energéticos mayores. Cuando los electrones vuelven a su estado fundamental, liberan esta energía acumulada observándose como fluorescencia en entre el rango de los 400 nm y 700 nm (rango de la luz visible), donde las cámaras fotográficas son capaces de capturarlas.

La características de color e intensidad de las fluorescencias depende de la naturaleza de los materiales, siendo frecuente en los de origen orgánico, y ocurre en los sistemas de enlaces dobles conjugados; mientras que en los materiales inorgánicos esta asociada a ciertas irregularidades en la estructura de los cristales, como espacios libres por distorsión de los planos cristalinos y a las impurezas, donde estas también pueden influir en el color de la fluorescencia como también disminuirla en intensidad hasta incluso opacarla completamente [2].

Algunos fenómenos que pueden afectar la fluorescencia podrían ocurrir cuando en la interacciones con otras moléculas mientras los electrones están siendo excitados, la energía puede ser traspasada a estas otras moléculas produciéndose el fenómeno de *quenching*, disminuyendo la fluorescencia o haciéndola desaparecer, como también a la molécula a la que fue transferida energía hacerla emitir luz. Por otro lado, factores como la temperatura y el pH, igualmente la pueden afectar.

La fluorescencia, también depende de la longitud de onda con la cual se estimule a los átomos de su estructura, donde los materiales pueden fluorescer en cierta longitud de onda y no fluorescer en otra longitud de onda. Por ejemplo, el plomo puede presentar una leve fluorescencia en UVA y una intensa fluorescencia de color azul cuando se estimula con UVC.

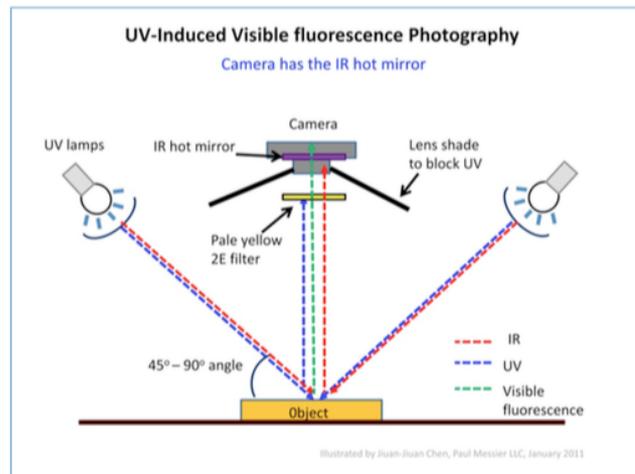


Fig. 3. Esquema de captura [11].

Finalmente, en general, los materiales orgánicos como resinas, adhesivos, aglutinantes, abrillantadores ópticos tienden a fluorescer de modo intenso bajo la radiación ultravioleta [2].

2.3. Técnica de captura

El equipo necesario para llevar a cabo la captura de la fluorescencia en el visible, consiste en una cámara fotográfica, dos lámparas de radiación UV de preferencia tubos que distribuyen la radiación de modo más parejo y difuso y un filtro barrera que bloquee el UV e IR proveniente de las lámparas que produce principalmente falta de nitidez, bajo contraste, ruido y que puede teñir el color de la fluorescencia debido al IR presente con una coloración magenta.

La posición de las fuentes de radiación, cámara y filtro debe seguir el esquema, como se muestra en la Figura 3 [5], tratando de conseguir la mejor distribución posible de la radiación sobre el objeto.

Existen en la web varios workflows creados por diferentes instituciones que van en ayuda en el procedimiento de trabajo para capturar la fluorescencia, con miras a conseguir un flujo de trabajo con métodos más o menos estandarizados.

Una interesante aporte hacia la estandarización y consistencias de las capturas por FUV, relativamente nueva, es la introducción en el mercado de dos cartas de referencia: Target-UV™, UV-Gray, donde la primera es un sistema de calibración para el control del color e intensidad en las capturas por FUV-UVA y la segunda es usada para setear el balance de blanco [6].

Por ultimo mencionar, que aunque hay varios problemas que se pueden producir en las capturas, uno muy interesante es la falla de "reciprocidad en el color", debido a que el sensor de la cámara puede no responder de forma lineal al color en exposiciones muy largas y tiende a exagerar el color azul que no tiene relación con lo observado directamente en el objeto"[2]. Figura 4.

3. APLICACIONES EN PROCESOS FOTOGRAFICOS

En términos generales el uso de FUV nos permite "deter-

minar la homogeneidad, similitudes y diferencias entre las partes o regiones de un objeto”[10] puesto que no es una técnica que por si misma pueda identificar la composición de materiales [2] pero “pone de manifiesto modificaciones naturales o artificiales que haya sufrido una obra”[9].

Un proyecto realizado, dentro del Advance Residency Program in Photograph Conservation, impartido por el Museo de la George Eastman House [12], examinaron diferentes procesos fotográficos con el objetivo de evaluar las aplicaciones y limitaciones de FUV en el análisis de fotografías para la identificación, caracterización, evaluación de alteraciones y tratamientos. Para esto utilizaron UVA, con filtro Kodak 2E y UVC, sin filtro. La investigación se enfocó en varios materiales, entre ellos en la examinación de los soportes de papel, en la corrosión de daguerrotipos y en el uso de ceras, aceites y resinas en diferentes procesos fotográficos.

El estudio concluyó que el uso de FUV en la examinación del soporte de papel es relevante en los materiales fotográficos y que muchos de los fenómenos descritos por los conservadores de papel, se encuentran en las fotografías; siendo muy eficiente para diferenciar tipos de papel, líneas de marea, adhesivos, moho, foxing, inclusiones metálicas y valorar su estado de conservación.

Se determinó que la ausencia o presencia de fluorescencia en los papeles fotográficos esta relacionada principalmente con la naturaleza y origen de las pastas y que el color e intensidad esta relacionado con el tiempo de mezcla, el tipo de carga y el tamaño, junto con el grado de blanqueo:

TABLA 1

Papel Fluorescente	Papel No fluorescente
Ligeramente blanco	Ligeramente violeta oscuro
Ligeramente amarillo	
Ligeramente gris	

Esta técnica no identifica tipos de papel pero puede diferenciar papeles en apariencia iguales [2], como se puede observar en la Figura 5.

Por otro lado, determinó que la mayor parte de los adhesivos son fluorescentes con variaciones en intensidad, menos Paraloid B-72 que no fluoresce. Aunque hay bibliografía que identifica tipos de adhesivos por su color e intensidad de fluorescencia, análisis complementarios son necesarios pues la mayor parte de los adhesivos se observan en tonalidades de amarillos o blancos o azules [3] [9]:

TABLA 2

Tipo	Patrón
Epóxidos	Blancos amarillentos brillante
PVA	Azulado lechoso
Acetato de celulosa	Blanco lechoso
Paraloid B-72	No excitable por luz UV
Nitrato de celulosa	Amarillento lechoso

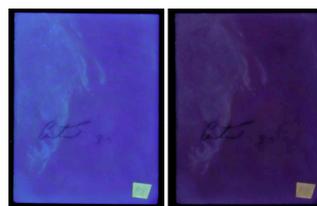


Fig. 4. La imagen de la izquierda corresponde a la captura con el color azul exagerado causando un aspecto nebuloso en la imagen y a la derecha con el color correcto compensado por filtraje UV y de compensación de color [2].

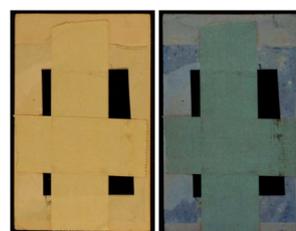


Fig. 5. Reverso de Ferrotipo. La imagen de la izquierda es registro con Luz visible. La imagen de la derecha por FUV [2].



Fig. 6. Manchas de moho bajo luz visible y FUV [2].

Como resultado, la técnica es útil también para detectar restos de adhesivos que no son visibles en condiciones de luz normal.

Hay líneas de marea que son solo posibles de ver por FUV e incluso muy evidentes después de tratamientos acuosos. Estudios asociados, han indicado que estas fluorescencias azules pueden ser indicador de un deterioro subsiguiente, donde desaparece la línea de fluorescencia y se convierte en oscura y la coloración comienza a aparecer en la luz visible. Pero esto no es sistemático así es que no significa que todas las líneas de mareas fluorescentes se comporten igual.

El moho es frecuente verlo en papeles y ciertos tipos fluorescen por FUV que en luz normal no se pueden observar. Figura 6

El foxing es en general visible por FUV y se puede observar en papeles fotográficos, donde FUV es muy útil para identificar diferentes tipos y detectar foxing no visible con sus características manchas amarillas pálidas o blancas. Algunas manchas de foxing mostraron centros negros o de un azul profundo con anillos concéntricos. Este tipo de mancha indica la presencia de partículas de metal, considerada una de las causas del desarrollo de foxing.

La mayoría de las partículas metálicas no son fluorescentes y por lo tanto aparecen negras en el soporte. Las manchas de oxido que aparecen de color naranja-café en el visible, son manchas negras en el papel de ferrotipos. Figura 7. También las purpurinas, polvos de bronce, mix de cobre-zinc o cobre-estaño en un vehículo como nitrocelulosa en un solvente orgánico aparecen negras bajo FUV.

Se descubrió en estudios anteriores que algunos daguerrotipos en ciertas zonas que presentaban corrosión, bajo UVC reaccionaban con una fluorescencia de color verde muy intensa. Figura 8. Por SEM y FTIR, se detectó la presencia de iones de cobre y cianuro que podrían corresponder a cianuro cuproso. Aunque los resultados fueron ambiguos, existen seis posibles orígenes para que este depósito pueda ser encontrado en daguerrotipos: por el uso de cianuro en el galvanizado, en el abrillantamiento o en la limpieza, y menos común debido al uso del cianuro para gravar placas galvanizadas, en el fijado o en el dorado de las placas [2].

En general, la observación de ceras, aceites y resinas aplicados en los papeles no arrojaron fluorescencia pero en polaroids por UVC, se observó dos recubrimientos que eran aplicados manualmente por el usuario como la vinilpridina, que no fluoresció al contrario fue muy oscuro y donde incluso casi no se puede ver la imagen; y el vinil acetato por UVA, que se observó transparente. En daguerrotipos, aunque raramente se le aplicaba una capa de protección, fue posible observarla, debido a que el metal no fluoresce y la mayoría de los daguerrotipos aparecen completamente oscuros en FUV pero algunos presentaron una fluorescencia azul, relacionándolo con el uso de Krylon, un acrílico usado en los años 1950s como capa de protección por artistas (el color azul es característico de los recubrimientos sintéticos y opuesto a los barnices naturales que son usualmente verde-amarillos). A colodiones sobre vidrio, usualmente se le aplicaba una capa de protección y es observable por FUV-UVA, por lo que pueden ser muy fácil distinguirlos de albuminas y opalotipos. En general, es detectado por FUV, las capas de protección aplicados en daguerrotipos, colodiones sobre vidrio, ferrotipos y en los marcos interiores de latón de los procesos en estuches.[2]

5. CONCLUSIONES

La técnica de fluorescencia inducida por radiación ultravioleta largamente utilizado en el diagnostico del estado de conservación del patrimonio histórico, ha ido mejorando notablemente su técnica de captura con miras a una estandarización que pueda hacer posible la comparación de resultados con mayor exactitud entre las tomas realizadas durante el tratamiento hasta poder comparar resultados con otras instituciones. Para esto, ya en el mercado se encuentran una serie de productos disponibles, como cartas de calibración, flujos de trabajo, metadatos editables en software a la vez que la información que es posible de obtener a través de ella, se incrementa día a día donde hay con mucho camino por explorar.



Fig. 7. Manchas de oxido negras por FUV [2].



Fig. 8. Daguerrotypo fluorescente por UVC [2].

REFERENCIAS

- [1] A. Mahón and J. Rorimer, "Ultra-Violet Rays and Their Use in the Examination of Works of Art", *Parnassus*, vol. 4, no. 4, p. 31, 1932.
- [2] C. Buzit, "The Use Of Ultraviolet-Induced Visible Fluorescence For Examination Of Photographs", Eastman Museum, Rochester. New York, 2005.
- [3] F. Espinosa Ipinza and V. Rivas, "Fluorescencia visible inducida por radiación UV. Sus usos en conservación y diagnóstico de colecciones. Una revisión crítica", *Revista Conserva*, vol. 16, pp. 27-38, 2011.
- [4] A. Cosentino, "Practical notes on ultraviolet technical photography for art examination", *Conservar Património*, vol. 21, pp. 53-62, 2015.
- [5] J. Dyer, G. Verri and J. Cupitt, *Multispectral Imaging in Reflectance and Photo-induced Luminescence modes: A User manual*, 1st ed. Londres, 2013, pp. 1-192.
- [6] "UV Innovations™: Ultraviolet Photography Standards", UV Innovations™: Ultraviolet Photography Standards, 2017. [Online]. Available: <http://www.uvinnovations.com/target-uv>. [Accessed: 14- Feb- 2017].
- [7] L. Alba Carcelén and A. Gonzalez Mozo, "Uso De La Luz Ultravioleta Para El Estudio Del Estado De Conservación De La Pintura De Caballete", in *II Congreso del GEIIC. Investigación en Conservación y Restauración CD*, Barcelona, 2017, pp. 1-12.
- [8] Grant. M.S, *The use of ultraviolet induced visible fluorescence in the examination of museum objects*, 1st ed. Whashington: National Park Service, 2000, pp. 1-4
- [9] L. Bosch Rubio, "La fluorescencia visible inducida por radiación Ultravioleta, apuntes para su uso e interpretación.", *MoleQla*, vol. 23, pp. 52-54, 2017.
- [10] J. Warda and F. Frey, *The AIC guide to digital photography and conservation documentation*, 1st ed. Washington, D.C: American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works, 2011.
- [11] J. Chen and P. Messier LLC, *Diagrams of Photography Setup*, 1st ed. 2011, p. 9.

[12] George Eastman Museum, 2017. [Online]. Available: <https://eastman.org/learn>. [Accessed: 14- Jun- 2017].



Pía Monteverde Puig es Licenciada en Bellas Artes con especialidad en Fotografía de la Universidad de Chile. Master en Conservación del Patrimonio Mueble en 2012 por la Universidad del Desarrollo, Chile. En el año, 2014, obtuvo un diplomado en Preservación y Gestión de Colecciones Fotográficas en el Museo de la George Eastman House, Rochester New York, USA. Desde 2011 hasta la actualidad trabaja en la unidad de

Documentación Visual e Imagenología en el Centro Nacional de Conservación y Restauración en Santiago de Chile. Actualmente cursa el Master en Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico, en la Universidad Pablo de Olavide.

Técnicas analíticas aplicadas a la caracterización de la fayenza egipcia

Joan Escudé González

Resumen—La fayenza es un tipo de material cerámico vitrificado y vidriado de componente silíceo. Originaria de Egipto y Oriente Medio, fue usada generalmente para piezas de pequeño tamaño de carácter decorativo o votivo. En este artículo se hace un breve recorrido por su historia y técnicas de producción y por las técnicas analíticas más usadas para su caracterización material y microestructural.

Palabras Claves— Fayenza egipcia, Antiguo Egipto, Técnicas analíticas, Vidriado.

1. INTRODUCCIÓN

El término fayenza procede del francés y fue usado para denominar a las cerámicas vidriadas de tipo mayólica procedentes de la ciudad italiana de Faenza durante los siglos XVI y XVII. Posteriormente, el significado se amplió debido a que los arqueólogos europeos del siglo XIX denominaron erróneamente como fayenza egipcia a las piezas de cerámica silícea descubiertas en Egipto [1].

La fayenza egipcia es básicamente una cerámica silícea vitrificada y vidriada. No tiene, por tanto, un componente arcilloso, sino que se compone de arena o cuarzo finamente molidos en su núcleo y de un recubrimiento vidriado de componente alcalino y calcáreo, a menudo coloreado por compuestos de cobre que le confieren su característico tono azul y verde [1].

Su uso se centró en piezas de tamaño pequeño o mediano como recipientes, azulejos, figuritas y objetos de adorno personal como amuletos, escarabeos (Fig. 1), pendientes, anillos y cuentas de collar [2].



Fig. 1. Anverso y reverso de un escarabeo de fayenza egipcia del Imperio Nuevo. Fotografías: Wikimedia commons

2. HISTORIA DE LA FAYENZA EGIPCIA

Los testigos de las primeras producciones de fayenza datan del quinto milenio antes de nuestra era en Mesopotamia y algo más tarde en Egipto, donde perduró hasta el período de dominación romana. Desde Egipto su producción se extendió a las islas del Egeo y posteriormente a casi toda Europa. Se considera a la fayenza el material

sintético más antiguo usado estrictamente para objetos rituales y decorativos [3].

El descubrimiento de un proceso de vidriado azul ocurrió probablemente relacionado con trabajos de fundición del cobre, metal cuyas técnicas de obtención y elaboración surgieron durante el mismo periodo de la prehistoria [4]. Se puede aventurar como la reacción entre el cobre del mineral de fundición, el sodio de las cenizas de las plantas usadas como combustible y el sílice de las paredes de arenisca del horno pudieron generar un vidriado de color azul similar al aspecto visual de la turquesa. La idea de poder sustituir la preciada piedra semipreciosa por un material sintético de producción económica jugó probablemente un papel importante en el éxito y la distribución de la producción de estos materiales en la antigüedad [5].

3. TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN

El proceso de preparación de la fayenza egipcia aún no ha sido documentado en todo su detalle y es que la variedad de resultados que se pueden obtener con ligeras modificaciones de las cantidades y naturaleza de los componentes hace que sea difícil documentar el proceso tal y como era llevado a cabo en la antigüedad. Numerosos ensayos de arqueología experimental han sido realizados en este ámbito sin conseguir esclarecer del todo el misterio de la producción de la fayenza [1], [4], [5], [6], [7].

Todas las fuentes coinciden en establecer tres métodos de producción del vidriado diferentes que fueron propuestos por Vandiver en 1983 [8]: eflorescencia, aplicación y cementación.

3.1. Vidriado por eflorescencia

Es un método de autovidriado. Los materiales de vidriado, sales de cobre y álcalis se mezclaban en húmedo con el cuarzo molido que iba a conformar el núcleo y se daba forma a esta pasta a mano o mediante moldes [1]. En el proceso de secado, al evaporar el agua, las sales migraban y cristalizaban en la superficie del objeto, formando una capa externa que durante la cocción fundía y generaba una capa de vidriado de grosor variable [3], [5], [9]. Los objetos realizados con este sistema de producción pueden

presentar marcas en las zonas de apoyo durante el proceso de secado e irregularidades en el grosor de la capa de vidriado. La capa será más gruesa en las zonas más expuestas, donde una mayor exposición al aire implicaba un mejor secado y por tanto una mayor eflorescencia [1].

3.2. Vidriado por aplicación

Se considera el método más comúnmente usado [1]. Los materiales de vidriado (cuarzo, fundente alcalino, cal y colorantes) eran finamente molidos y mezclados con agua para formar una pasta que se aplicaba al núcleo de cuarzo mediante pincel o goteo [1]. Posteriormente se procedía a su cocción a unos 950 °C [9]. Esta técnica puede ser reconocible por la presencia de marcas de pincel, gotas y líneas en el vidriado, así como considerables variaciones en el grosor del mismo [1].

3.3. Vidriado por cementación

También es un método de autovidriado. Se denomina también técnica Qom debido a que esta ciudad de Irán fue un centro productor de fayenza con esta técnica hasta la época contemporánea [1]. El objeto, tras el proceso de conformación y secado, se recubre con el polvo de los compuestos de vidriado y todo el conjunto es sometido a temperatura (Fig. 2). Durante el proceso de cocción a unos 1000 °C se genera por reacción una capa de vidriado sobre el núcleo de cuarzo que se podrá observar al retirar los restos de la mezcla de vidriado que no han cristalizado sobre la pieza [1], [5], [9]. Este método se caracteriza por la uniformidad del grosor de la capa de vidriado y la ausencia de marcas de secado o cocción.

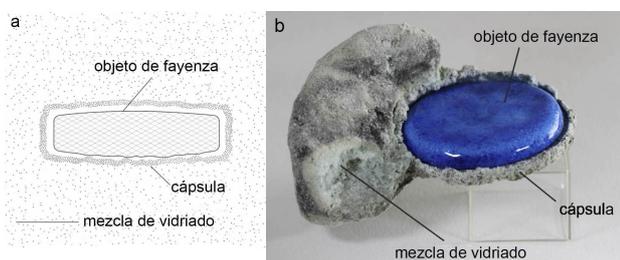


Fig. 2. Diagrama esquemático del vidriado por cementación (a) y pieza obtenida en laboratorio por este método (b) [1].

No obstante, estas técnicas no son excluyentes, y a veces podían usarse en combinación en un mismo objeto [1].

Con las técnicas analíticas disponibles, puede ser difícil establecer con seguridad el método de vidriado utilizado en el proceso de fabricación [7]. Si bien es cierto que éste viene a menudo determinado principalmente por el tipo de objeto que se está produciendo. Por ejemplo, la cementación presenta la ventaja de que se puede proceder a un vidriado simultáneo de un gran número de piezas pequeñas, todas cubiertas con la mezcla de vidriado en un mismo recipiente [1]. Sin embargo es menos adecuada para objetos grandes que requerirían una gran cantidad de mezcla. El método de la eflorescencia tiene la ventaja de que, en combinación con el moldeado, puede ser una técnica apta para la producción en serie de objetos de tamaño mediano. La aplicación es un método adecuado para incrustaciones y azulejos que solo necesitan vidriado por una de sus caras y para objetos policromos [9].

4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

La aplicación de técnicas analíticas al estudio de la fayenza se dirige fundamentalmente a la observación de su microestructura, que nos puede indicar la tecnología de producción y el método de vidriado, y a su caracterización química elemental y molecular, que nos puede indicar desde los colorantes usados en el vidriado hasta la temperatura de cocción.

4.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM-EDX y SEM-EDS)

El principal uso del SEM es la observación de las microestructuras de la fayenza mediante secciones en lámina delgada. Las imágenes del SEM típicamente muestran una capa externa de vidriado, sin presencia de cuarzo, una segunda capa de transición o interfase entre el núcleo de cuarzo y el vidriado en la que se pueden observar partículas de cuarzo incluidas en una capa más o menos continua de materia vítrea y una última fase, el núcleo en sí mismo, donde observamos la matriz de partículas de cuarzo cementada por una cantidad variable de material vítreo intergranular [9] (Fig. 3).

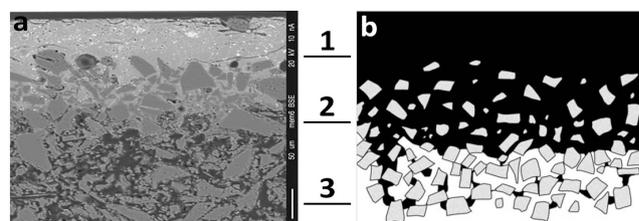


Fig. 3. Microfotografía obtenida al microscopio electrónico mediante observación en lámina delgada (a) y esquema de la estratigrafía estructural de una fayenza egipcia (b) donde podemos observar las tres capas características: en primer lugar la superficie vidriada, en segundo lugar la capa de interacción entre el núcleo y el vidriado y en tercer lugar el núcleo de cuarzo [9], [10].

Tite y Bimson [11] propusieron que era posible distinguir los diferentes tipos de vidriado mediante la observación de la microestructura de la fayenza, refiriéndose especialmente a las diferencias de grosor en las capas de vidriado y de interacción núcleo/vidriado. Los análisis llevados a cabo en piezas arqueológicas y en objetos replicados experimentalmente en el laboratorio tienden a mostrar que objetos vidriados por cementación acostumbra a tener capas de vidriado e interfase más delgadas y menos vidrio intergranular. Por contra el vidriado por eflorescencia muestra capas más gruesas y más cantidad de material vítreo intergranular. En el caso del método de aplicación, se observa menos vidrio intergranular y una delgada capa de interfase, pero la capa de vidriado tiende a ser más gruesa [1].

Esta técnica también se suele utilizar para la observación de ciertos defectos de los objetos que se deben a propiedades intrínsecas del material y a su proceso de fabricación. Por ejemplo, la presencia de burbujas y chimeneas en la capa de vidriado, que se formaron seguramente cuando esta estaba aún líquida para la evacuación de gases del núcleo, especialmente CO₂ formado por la descomposición de Na₂CO₃ y CaCO₃ durante la cocción; o la observación de microfracturas formadas durante el en-

friamiento debido a los diferentes coeficientes de dilatación de las distintas fases del núcleo del material [5].

Puede existir un cierto inconveniente para el estudio de las microestructuras internas en piezas de fayenza con SEM. Es común que exista cierta abundancia de objetos que permita la destrucción de algunos de ellos para la confección de láminas delgadas en sección, no obstante, estudios recientes han aplicado una técnica no invasiva de escaneado en 3D para las capas más externas: la tomografía de coherencia óptica (OCT). La OCT es una técnica sin contacto capaz de conformar una imagen tridimensional de las microestructuras interiores hasta una profundidad de 2-3 mm de materiales transparentes o semitransparentes. Fue desarrollada para la observación en vivo del ojo y la retina y recientemente se ha aplicado como técnica analítica no invasiva en patrimonio cultural, especialmente para la observación de capas de pintura y barniz, objetos policromados, jades, cerámicas vidriadas, vidrios y esmaltes pintados [9]. Sus cualidades no destructivas permiten su uso en un rango de piezas más amplio que el SEM y en piezas de especial valor o singularidad. Aun así, su nivel de penetración a veces puede ser insuficiente y hay que decir que no consigue la nitidez y el nivel de detalle que nos proporciona el SEM.

Al acoplar al microscopio electrónico un dispositivo de espectroscopia (EDX/EDS) podemos realizar también el análisis elemental compositivo de las muestras [3], [4], [5].

4.2. Fluorescencia de rayos X (XRF) y emisión de rayos X por inducción de partículas (PIXE)

La XRF es una técnica muy utilizada para analíticas *in situ* ya que existen versiones portátiles de amplia manejabilidad. Es una técnica que ofrece un gran número de características de análisis interesantes: alta sensibilidad, análisis multielemental cuantitativo, no invasiva. Sin embargo, en su uso fuera del laboratorio puede perder una cierta efectividad, lo que hace que muchos restrinjan su uso en esas condiciones a análisis de carácter cualitativo [12].

La detección elemental de esta técnica ha sido usada también para la caracterización elemental *in situ* de los colorantes de piezas de variada coloración [2].

4.3. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y difracción de rayos X (XRD)

Estas técnicas nos dan información acerca de los compuestos químicos presentes en las muestras. Son métodos destructivos y las piezas deben molerse para poder ser analizadas pero la FT-IR puede ser portátil y presenta la posibilidad de usarla en el trabajo de campo. Pueden ser útiles para la identificación de pigmentos del vidriado: óxidos de hierro y manganeso (rojo y negro), antimoniatos de plomo (amarillo), azul egipcio, etc. [2]. También nos pueden indicar mecanismos de alteración al detectar cloruros básicos de cobre (atacamita y paratacamita), producto de alteración de los compuestos de cobre (azul egipcio) y responsables de cambios de coloración de azul a verde [3].

4.4. Espectroscopía Raman

Utilizada para la caracterización mineral de los compuestos de cuarzo del núcleo de los objetos. La posibilidad de

distinguir entre las diferentes fases polimórficas del cuarzo sometido a altas temperaturas (tridimita y cristobalita) nos puede dar una estimación de la temperatura de cocción del objeto, ya que la tridimita se forma a partir de los 1000 °C y la cristobalita a temperaturas superiores. Para esta técnica se usan también secciones en lámina delgada y pueden ser las mismas usadas en el SEM, eso sí, tras limpiar la capa de carbono conductor que se debe aplicar sobre la superficie para su observación al microscopio electrónico [2].

5. CONCLUSIONES

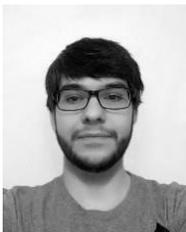
La fayenza es un material arqueológicamente interesante y abundante y su estudio nos aporta valiosa información arqueológica acerca del nacimiento de las artes y las técnicas de producción de la industria del vidrio.

La aplicación de las diversas técnicas analíticas a su estudio arroja luz sobre la historia de un material de composición aparentemente sencilla pero que aún tiene numerosos secretos por revelar.

REFERENCIAS

- [1] M. Matin and M. Matin, "Egyptian faience glazing by the cementation method part 1: an investigation of the glazing powder composition and glazing mechanism," *Journal of Archaeological Science*, vol. 39, no. 3, pp. 763-776, Mar. 2012.
- [2] M. B. Toffolo, E. Klein, R. Elbaum, A. J. Aja, D. M. Master, and E. Boaretto, "An early Iron Age assemblage of faience beads from Ashkelon, Israel: chemical composition and manufacturing process," *Journal of Archaeological Science*, vol. 40, no. 10, pp. 3626-3635, Oct. 2013.
- [3] A. Moussa and M. F. Ali, "Color Alteration of Ancient Egyptian Blue Faience," *International Journal of Architectural Heritage*, vol. 7, no. 3 (December), pp. 261-274, 2013.
- [4] M. Matin, "An experimental investigation into the accidental invention of ceramic glazes," *Archaeometry*, vol. 56, no. 4, pp. 591-600, 2014.
- [5] S. La Delfa, V. Formisano, and E. Ciliberto, "Laboratory production of Egyptian faiences and their characterization," *Journal of Cultural Heritage*, vol. 9, pp. e113-e116, Dec. 2008.
- [6] S. Quirke and Z. Tajeddin, "Mechanical reproduction in the age of the artwork? Faience and 5000 moulds from 14th-century BC Egypt," *Visual Communication*, vol. 9, no. 3, pp. 341-361, Aug. 2010.
- [7] M. S. Tite, P. Manti, and A. J. Shortland, "A technological study of ancient faience from Egypt," *Journal of Archaeological Science*, vol. 34, no. 10, pp. 1568-1583, Oct. 2007.
- [8] P. B. Vandiver, "Egyptian faience technology," in *Ancient Egyptian Faience: an Analytical Survey of Egyptian Faience from Predynastic to Roman Times*, A. Kaczmarczyk and R. E. M. Hedges, Eds. Warminster: Aris and Phillips, 1983, pp. A1-A144.
- [9] H. Liang, M. Sax, D. Saunders, and M. Tite, "Optical Coherence Tomography for the non-invasive investigation of the microstructure of ancient Egyptian faience," *Journal of Archaeological Science*, vol. 39, no. 12, pp. 3683-3690, 2012.

- [10] A. J. Shortland and M. S. Tite, "Technological study of Ptolemaic - Early Roman faience from Memphis, Egypt," *Archaeometry*, vol. 47, no. 1, pp. 31-46, 2005.
- [11] M. S. Tite and M. Bimson, "Faience: an investigation of the microstructures associated with the different methods of glazing," *Archaeometry*, vol. 28, no. 1, pp. 69-78, Feb. 1986.
- [12] L. De Viguerie, A. Duran, A. Bouquillon, V. A. Solé, J. Castaing, and P. Walter, "Quantitative X-ray fluorescence analysis of an Egyptian faience pendant and comparison with PIXE," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, no. 7, pp. 2219-2225, 2009.



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.