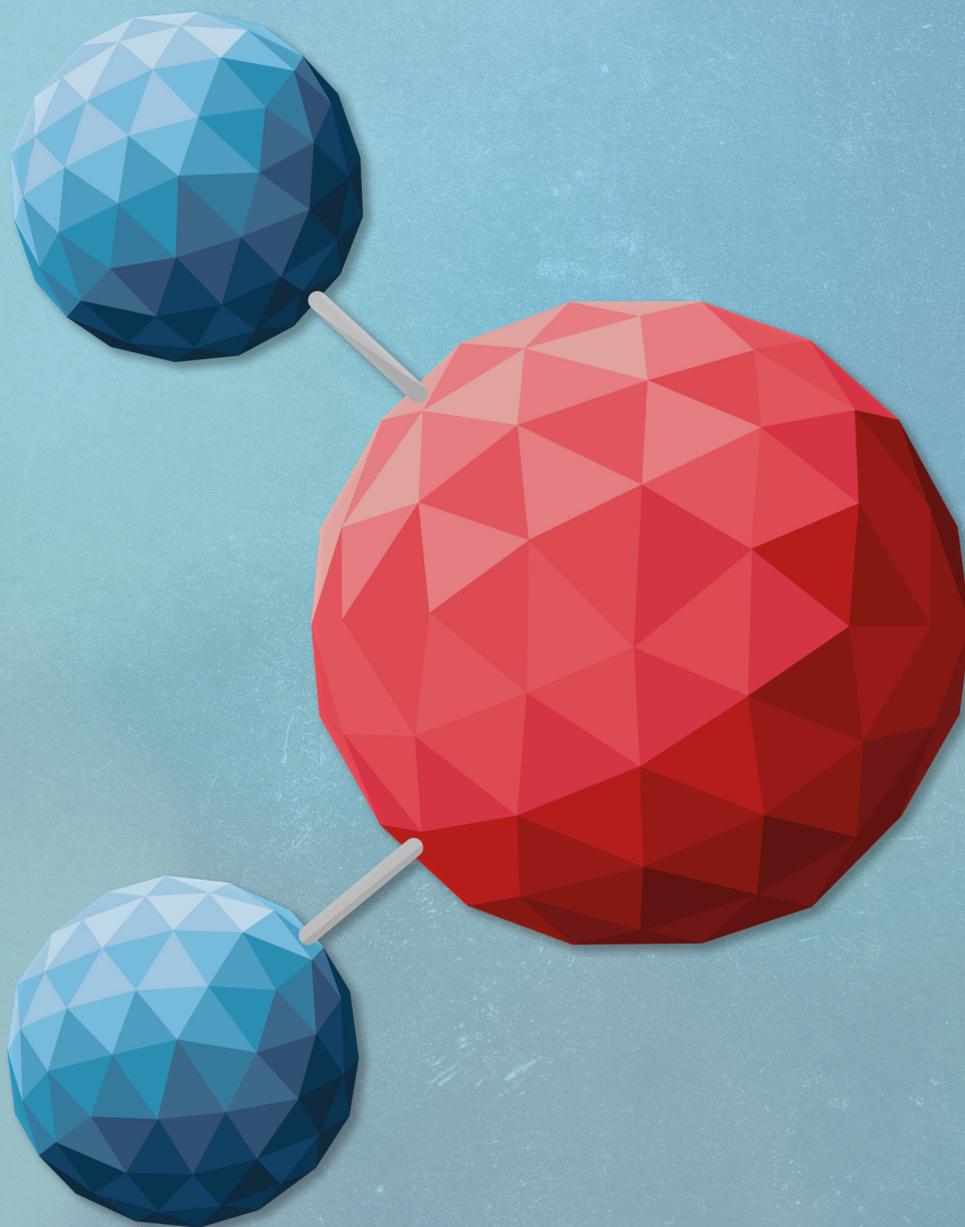


MOLEQLA

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

·Número 27·



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 Forense: Antonio Aguilar García

MoleQla Celular: Guillermo López Lluch

MoleQla Biotecnología: Cristina Guillén Mendoza

MoleQla Patrimonio: María Pilar Ortiz Calderón

MoleQla Farmacia: Matilde Revuelta González

MoleQla Nanotecnología: Ana Paula Zaderenko Partida

MoleQla Química: Patrick J. Merklings

Responsables de maquetación de las secciones que aparecen en este número

Cristina Guillén Mendoza

Juan Antonio del Castillo

Almudena García Sánchez

Alba Jiménez Díaz

Responsables de Maquetación Global

Rafael Rastrero Prieto

Francisco Araque Frías

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. Merklings



ISSN 2173-0903

Editado el 16 de octubre de 2017

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

En esta edición de MoleQla, os proponemos descubrir las curiosas propiedades de los fluorocarburos, que van mucho más allá del recubrimiento en sartenes antiadherentes. Dicho de paso, esta tecnología no es producto de los programas espaciales, a pesar de los persistentes rumores. No tiene más que mirar el desmentido de la página de la NASA, aunque esta agencia si ayudó a popularizar el polímero. En una contribución medioambiental, os comentamos como la biolixiviación puede ayudar a extraer y recuperar metales pesados.

También contamos con mucha medicina, desde la interacción con el paciente hasta el nivel molecular, y pasando por el intrigante artículo sobre adaptaciones de los organismos a las altas presiones del mundo abismal. Por ejemplo, os presentamos nuevos fármacos contra la tuberculosis, una enfermedad que, tristemente, se ha proclamado, junto al SIDA, como la enfermedad más mortífera a nivel mundial, y os contamos en otro artículo algunas aplicaciones de la revolucionaria técnica de CRISPR, de la que volveremos escuchar hablar numerosas veces debido a su extraordinaria potencia para editar genomas.

Y tampoco falta en este número la siempre surtida sección de patrimonio que nos descubre las técnicas detrás del análisis y restauración de obras de arte desde los tiempos más remotos, al imagen del uso de la espectroscopia Raman en pinturas rupestres.

Os deseo buena lectura.

Patrick Merkling



ÍNDICE

1. Moleqta Nanotecnología

- 1.1. Fluorocarburos en emulsión: herramientas del futuro de la medicina
- 1.2. El uso de lentes de contacto en el tratamiento de la glaucoma

2. Moleqta Celular

- 2.1. Adaptaciones de los organismos a las altas presiones del mundo abisal
- 2.2. Uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales: gran avance en la práctica clínica
- 2.3. TLOs: Cuando el sistema inmune se asienta en el campo de batalla

3. Moleqta Patrimonio

- 3.1. Aplicaciones de la espectroscopia Raman para el estudio del arte rupestre
- 3.2. Conservación Preventiva aplicada a material orgánico de origen antropológico
- 3.3. Colorimetría en el estudio del envejecimiento de polímeros y viabilidad de intervenciones de adhesión y consolidación en pintura

4. Moleqta Forense

- 4.1. Un vistazo a la ciencia forense. El denominado “efecto CSI”

5. Moleqta Biotecnología

- 5.1. Aplicaciones de CRISPR en la generación y síntesis de nuevos fármacos

6. Moleqta Farmacia

- 6.1. Nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis
- 6.2. Ocrelizumab, Nuevo fármaco contra la esclerosis múltiple

7. Moleqta Química

- 7.1. Biolixiviación y su aplicación en las aguas residuales

Fluorocarburos en emulsión: herramientas del futuro de la medicina

Juan Morillas Viñuales

Resumen—Los fluorocarburos son compuestos orgánicos que presentan una serie de características físico-químicas que los hacen interesantes para la formulación de emulsiones y microemulsiones con numerosas aplicaciones en campos como la biomedicina.

Palabras Claves— Fluorocarburos, emulsiones, microemulsiones, coloides, surfactantes, interfases, nanotecnología, ingeniería de materiales, drug delivery, hipoxia.



1. FLUOROCARBURAS: PROPIEDADES

Cuando hablamos de fluorocarburos o de perfluorocarburos (PFCs) nos referimos a compuestos químicos que presentan un esqueleto carbonado (C) sustituido mayoritariamente por enlaces covalentes a átomos de flúor (F), formando enlaces C-F [1]. Son análogos a los hidrocarburos, pero presentan propiedades físico-químicas únicas que los diferencian enormemente.

El enlace C-F es uno de los enlaces covalentes más estables y poco reactivos que se conocen [1] (485 kJ/mol de entalpía aproximadamente de media, frente a los 425 kJ/mol del enlace C-H) [2]. Esto se debe a que el flúor es el elemento más electronegativo de la tabla periódica, y forma con el carbono un enlace enormemente polarizado, que presenta ciertas características intermedias entre el enlace covalente y el iónico. Esto hace que estos compuestos sean casi inertes, en comparación con su contraparte hidrocarbonada [1]. Otra característica que diferencia a los fluorocarburos de los hidrocarburos es su tamaño: F presenta un radio de van de Waals de 1.5 angstroms aproximadamente, frente a los 1.2 angstroms del H [2]. Esta aparentemente nimia diferencia de tamaño atómico hace que las moléculas fluorocarbonadas sean muy voluminosas, y reducen la libertad conformacional de la molécula drásticamente [1].

Como resultado de estas tres propiedades, los fluorocarburos tienen una geometría muy diferente a la de sus análogos del hidrógeno. Por ejemplo, los fluoroalcanos lineales (fluorocarbonos lineales saturados) se disponen tridimensionalmente formando estructuras similares a hélices o cilindros, en contraposición a la clásica estructura en zig-zag a la que tienen acostumbrados los hidrocarburos saturados [3].

Los fluorocarburos no solo son hidrofóbicos al igual que los hidrocarburos: la altísima electronegatividad del F hace que el átomo sea poco propicio a formar dipolos

instantáneos, es decir, el flúor tiene una baja polarizabilidad. Como consecuencia las fuerzas de dispersión de London (un tipo de interacción intermolecular) de estos compuestos son muy débiles, lo que en última instancia provoca que sean lipofóbicas. Estamos, pues, ante sustancias que no tienen afinidad ni por fases acuosas ni por fases lipídicas [2].

En condiciones normales la mayoría de los fluorocarburos son líquidos y presentan tensiones superficiales muy bajas en comparación con la del agua [2]. Son muy fluidos; algunos modelos matemáticos los tratan como gases ideales en este aspecto, con bastante éxito [3]. Presentan una muy alta solubilidad de pequeños gases como el O₂ o el CO₂ [1]. Si se añade una cadena fluorocarbonada a una molécula anfipática, por lo general se potencia el carácter anfipático de ésta (hay algunas raras excepciones a esta generalización) [2].

Todas estas propiedades físico-químicas hacen que los fluorocarburos sean de interés para muchos campos de la ingeniería química moderna, y en especial, para la ingeniería de materiales y la nanotecnología. Se usan materiales fluorocarbonados, por ejemplo, en la fabricación de tejidos que repelen el agua. Los fluorocarburos también ofrecen prometedoras perspectivas en la intersección de la ingeniería biomédica y la de materiales. El diseño de materiales estructurados a escala microscópica con multitud de fines, como la dosificación de fármacos, se lleva estudiando desde hace años, y los fluorocarburos han jugado un rol importante en estas investigaciones [2]. Con estos compuestos se han fabricado geles y cristales líquidos con propiedades y aplicaciones de gran interés [3], pero en esta ocasión nos centraremos en otro tipo de materiales: las emulsiones y microemulsiones.

2. EMULSIONES Y MICROEMULSIONES DE FLUOROCARBURAS

➤ Generalidades:

Una emulsión es una dispersión coloidal de dos (o más)

líquidos inmiscibles, como pueden serlo el agua y el aceite, que se estabiliza gracias a la acción de una tercera sustancia llamada tensioactivo o surfactante [2]. Los surfactantes son sustancias anfipáticas, que en su estructura molecular presentan una parte más afín por un medio determinado, y otra parte afín por un medio diferente. Como ejemplo, hay surfactantes que presentan una parte afín a medios acuosos, y otra parte afín a medios lipídicos. Un jabón es un ejemplo cotidiano de tensioactivo.

Cuando mezclamos dos fluidos inmiscibles estos tienden a separarse, formando dos fases separadas por lo que denominamos una interfase. Un tensioactivo se sitúa en una interfase e interacciona simultáneamente con ambas fases, con lo que se consigue disminuir la tensión interfacial de la mezcla. Esto disminuye la energía del sistema, lo cual lo estabiliza. De esta manera podemos obtener mezclas estables de fases en principio inmiscibles, inestables al mezclarse: una emulsión. No se forman por lo general espontáneamente, y suele ser necesario un aporte de energía. En líneas generales son cinéticamente estables, lo que quiere decir que, con el paso del tiempo, perderán su estabilidad [2]. Ejemplos cotidianos de las emulsiones son la mayonesa o las vinagretas, en las que es fácil reconocer todas estas características.

Como en todo coloide, en una emulsión distinguimos una fase dispersa y una continua. A partir de dos líquidos inmiscibles podemos obtener varios tipos de emulsiones dependiendo de cuál sea la fase dispersa y cuál la continua. La identidad de las fases depende fundamentalmente de dos factores: las proporciones de los dos líquidos inmiscibles, y la naturaleza del surfactante escogido. Así, pueden obtenerse emulsiones en las que el agua es la fase continua y el aceite es la dispersa ("oil-in-water emulsions"), y emulsiones en las que sucede lo contrario ("water-in-oil emulsions"). Con ciertas composiciones pueden obtenerse mezclas estructuradas más complejas, como emulsiones en las que la fase continua es acuosa y la dispersa es otra emulsión de agua en aceite ("water-in-oil-in-water emulsions"), y emulsiones en las que la identidad de las fases es la inversa, y tenemos una fase continua oleosa y una emulsión de aceite en agua como fase dispersa ("oil-in-water-in-oil emulsions") [3].

Un tipo especial de emulsiones son las microemulsiones: se forman espontáneamente y son termodinámicamente estables si se preparan con una proporción de componentes inmiscibles y de surfactante determinada, y en un cierto rango de temperaturas y presiones. La fase dispersa forma micelas de tamaños del orden de la micra, por lo que las microemulsiones son transparentes a diferencia de la mayoría de coloides, que presentan el efecto Tyndall [2]. La alta estabilidad de una microemulsión es interesante a la hora de preparar un material que posiblemente deba almacenarse durante largos periodos de tiempo [3].

➤ Fluorocarburos y emulsiones:

El rol que juegan los fluorocarburos en el mundo de las emulsiones es doble: no solo constituyen una de las fases inmiscibles de la mezcla, también se suelen añadir cadenas fluorocarbonadas a surfactantes ya existentes para potenciar su carácter anfipático y convertirlos en surfactantes más potentes, que reducen la tensión interfacial aún más que sus contrapartes hidrocarbonadas. Son los fluorosurfactantes.

El carácter tanto lipóforo como hidrófobo de los fluorocarburos da lugar a interesantes y complejas construcciones: se pueden crear emulsiones en las que un tercer tipo de fase líquida entra en juego. Se han obtenido emulsiones de agua en aceite estabilizadas por surfactantes que tienen afinidad por una parte al agua y por otra al aceite. Posteriormente esta emulsión se ha usado como la fase dispersa de otra en la que la fase continua es un fluorocarburo, estabilizada por un tipo de surfactante especial: los dibloques fluorocarburo-hidrocarburo, que tienen dos partes: una hidrocarbonada afín a la fase oleosa, y otra fluorocarbonada afín a la fase fluorosa [2] [4]. Estas emulsiones complejas abren la puerta a numerosas aplicaciones tecnológicas.

Una de las razones por las que los fluorocarburos como componentes de una emulsión son interesantes es su superior capacidad de disolver gases en comparación con los compuestos hidrocarbonados [3]. Como más adelante veremos, esta característica está en el centro de muchas de las aplicaciones tecnológicas que se están dando a estos sistemas.

La estructura tridimensional característica de los fluorosurfactantes hace que no solo sean capaces de adoptar las típicas estructuras micelares y de bicapa que acostumbran a tomar en agua sus contrapartes hidrocarbonadas. Ciertas especies fluorocarbonadas, en condiciones muy específicas, son capaces de formar túbulos, dejando un hueco en él que puede aprovecharse a la hora de diseñar aplicaciones nanotecnológicas [3].

3. APLICACIONES

A día de hoy, las emulsiones con fluorocarburos están siendo investigadas en campos muy diversos. Especialmente prometedores son los avances hechos en biomedicina, ya que estos materiales se están usando principalmente con dos finalidades generales: como transportadores de oxígeno a los órganos y como métodos de *drug delivery*, o distribución de fármacos.

➤ Distribución de oxígeno:

Las emulsiones fluorocarbonadas se han empleado para reducir el daño en situaciones de estrés hipóxico (poco oxígeno disponible para el cuerpo). Un ejemplo de estas situaciones sería una cirugía. Durante una operación quirúrgica el paciente pierde mucha sangre. Por lo general esto se suplente con transfusiones de sangre de donantes. Sin embargo esta sangre no está siempre

disponible. Se han empleado emulsiones de fluorocarburos, que disuelven tanto el O₂ como el CO₂ mejor que el agua o los hidrocarburos, como sustitutos temporales de la sangre. La emulsión permite que se dé el intercambio gaseoso durante un tiempo, hasta que se restablecen los niveles normales de sangre en el paciente [2] [3]. Estas emulsiones son biológicamente inertes a efectos prácticos, y su toxicidad es muy baja o indetectable para ciertos compuestos fluorocarbonados [2] [3]. Los componentes fluorocarbonados de la emulsión son finalmente excretados por el organismo de manera normal [2].

Este tipo de estrategias se han planteado para todo tipo de situaciones en las que hay riesgo de hipoxia. Se han aprobado para su uso muchos productos de este tipo: Fluosol® se aprobó por la FDA en 1989, y Oxygent superó la fase III de los ensayos clínicos europeos en 2001 [2]. El inconveniente fundamental de estas mezclas es que no son muy estables, por lo que no pueden almacenarse durante largos periodos, y necesitan ser preparados para cada uso, lo que puede ser problemático porque las proporciones adecuadas son vitales para el correcto funcionamiento del sistema [2] [3].

➤ Distribución de fármacos:

Las estrategias desarrolladas en el campo de la *drug delivery* con compuestos fluorocarbonados son muy diversas y variopintas. Algunas de las más complejas consisten en elaborar emulsiones en las que se forman los nanotubos antes descritos, y confinar el fármaco a distribuir en la fase acuosa u oleosa que queda en el interior [3] [5].

En otros casos se elaboran complejas emulsiones del tipo "oil-in-water-in-fluorocarbon", dejando el fármaco a liberar disuelto en la fase oleosa si es predominantemente lipofílico, o emulsiones tipo "water-in-oil-in-fluorocarbon" disolviendo el fármaco en la fase acuosa si es hidrofílico. En estos casos, las diferentes tasas de difusión de los fármacos en las distintas fases permiten modular la liberación del fármaco. Jugando con las proporciones y las naturalezas químicas de cada fase se puede lograr que el fármaco se libere al medio a distintas velocidades, en función de lo que se requiera. Al ser la fase en contacto con el medio biológicamente inerte, no hay problema en este aspecto [3]. Sin embargo, los fluorosurfactantes han demostrado no ser tan inocuos como los fluorocarburos, y para algunos compuestos concretos la toxicidad es lo suficientemente alta como para no poder emplearse en la práctica clínica [2]. Este es un campo naciente, en investigación, pero muy prometedor.

4. CONCLUSIONES

Los fluorocarburos y fluorosurfactantes son sustancias cuyas curiosas propiedades las hacen ideales para tecnologías que requieran la separación de fases o de sustancias, o el autoensamblaje de estructuras a escala nanométrica. Si bien aquí hemos tratado

fundamentalmente sus más estudiadas aplicaciones biomédicas, este tipo de materiales tienen potenciales aplicaciones en muchos campos tecnológicos y científicos. La investigación de la química-física de interfases de este tipo parece prometedora a día de hoy. El tiempo dirá en qué queda ese potencial.

REFERENCIAS

- [1] D. O'Hagan, "Understanding organofluorine chemistry. An introduction to the C-F bond," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, no. 2, pp. 308-19, 2008.
- [2] M. P. Krafft, "Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, no. 2-3, pp. 209-228, 2001.
- [3] J. G. Riess, "Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective," *Tetrahedron*, vol. 58, no. 20, pp. 4113-4131, 2002.
- [4] H. M. Courrier, T. F. Vandamme, and M. P. Krafft, "Reverse water-in-fluorocarbon emulsions and microemulsions obtained with a fluorinated surfactant," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 244, no. 1-3, pp. 141-148, 2004.
- [5] A. E. C. Palmqvist, "Synthesis of ordered mesoporous materials using surfactant liquid crystals or micellar solutions," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 8, pp. 145-155, 2003.



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

El uso de lentes de contacto en el tratamiento del glaucoma

Marta Rojas Rodríguez

Resumen— El glaucoma, enfermedad que afecta al ojo, y que puede producir ceguera, si es tratada a tiempo puede no llegar a ser grave. Para ello, se están desarrollando nuevos métodos tanto para el diagnóstico temprano de la enfermedad como para el desarrollo de nuevos métodos de administración de fármacos. En este artículo se discuten diferentes métodos que aplican la nanotecnología a la utilización de lentes de contacto como sistema de administración de fármacos.

Palabras Claves— Glaucoma, Lentes de contacto, Liberación controlada, Maleato de timolol.

1. INTRODUCCIÓN

El glaucoma es una enfermedad de los ojos caracterizada por el aumento de la presión intraocular y puede desembocar en pérdida de visión o ceguera por la pérdida progresiva de las fibras nerviosas del nervio óptico [1].

Se estima que en el año 2020 habrá más de 79 millones de personas afectadas por esta enfermedad [2]. Aunque hay gran variedad de tratamientos no quirúrgicos, uno de los mayores problemas en el tratamiento de estas enfermedades es que los pacientes no cumplen en su totalidad con la medicación. Uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la enfermedad es el maleato de timolol, un β -bloqueante no selectivo que ayuda a reducir la presión intraocular en el ojo y puede ser dispensado de formas diferentes.

Las administraciones de gotas oftálmicas es el tratamiento más habitual, pero es bastante ineficiente ya que gran parte del medicamento se pierde por el conducto nasolagrimal, la biodisponibilidad es bastante baja (entre el 1 y el 5%) y son poco resistentes a la película lagrimal por lo que el tiempo de permanencia en el ojo no suele ser superior a los 3 minutos [3]. Otras opciones que se han estado estudiando han sido las películas mucoadhesivas, geles *in-situ*, liposomas y nanopartículas poliméricas, aunque parece que lo más efectivo, actualmente, es el uso de lentes de contacto como dispositivo para la administración del fármaco, ya que aumentan bastante su disponibilidad [4].

En este artículo se discute del uso que se está haciendo de la nanotecnología y que está revolucionando el uso de lentes de contacto como sistema de administración de fármacos para controlar la liberación tanto espacial como temporal del medicamento.

2. BARRERAS FÍSICAS Y OTROS PROBLEMAS EN EL TRATAMIENTO DEL GLAUCOMA

A la hora de desarrollar dispositivos para la adminis-

tración de fármacos en el sistema ocular hay varios tipos de barreras que hay que superar. Entre ellas se encuentran la película lagrimal que protege la parte anterior de la superficie del ojo, el complejo epitelio de la córnea o la barrera hematoacuosa que limita el paso de moléculas desde la sangre a la parte interior del ojo, entre otras.

Aparte de estas barreras físicas se encuentran otro tipo de problemas a los que se les están intentando buscar soluciones como por ejemplo, controlar la liberación del fármaco tanto de forma espacial como temporal, para que la concentración del agente activo se mantenga constante durante periodos de tiempo prolongados, o proporcionar rutas de administración más cómodas o novedosas que sean capaces de llegar a zonas de difícil acceso dentro del ojo para así poder aumentar su eficacia terapéutica [5].

Otro tipo de problemas que hay que afrontar a la hora de desarrollar nuevos sistemas de administración de fármacos es el coste de fabricación, la rentabilidad, la estabilidad de estos para que el fármaco no se libere de forma descontrolada y el hecho de que los pacientes no cumplan con el tratamiento por ser difícil o incómodo de administrar [4].

Por ello, el uso de lentes de contacto junto con nanopartículas está siendo un abordaje que se está estudiando, aunque todavía no se han desarrollado ensayos clínicos en humanos.

3. TIPOS DE TRATAMIENTO CON LENTES DE CONTACTO

El uso de gotas oftálmicas es el tratamiento más común a día de hoy, pero se están considerando otro tipo de métodos que puedan aumentar la efectividad a la hora de tratar el glaucoma y poder así, mejorar la calidad de vida del paciente.

Actualmente se están realizando múltiples estudios con varios tipos de tratamientos usando lentes de contacto junto a nanopartículas. A continuación, veremos algunos ejemplos.

3.1. Lentes de contacto impregnadas en el fármaco

Se ha visto que la administración de fármacos mediante lentes de contacto prolonga la liberación del medicamento durante varias horas. En un estudio realizado por Cheng-Chun Peng et al. se utilizaron lentes de contacto de hidrogel de silicona [6]. Las lentes se cargaron con vitamina E ya que se ha visto que amplían el periodo de liberación del fármaco. Después se cargó el fármaco (maleato de timolol) sumergiendo las lentes en una disolución de este, hasta equilibrar el periodo de liberación (7 días en lentes sin vitamina E y 21 días en lentes con vitamina E). Se midió la liberación del fármaco tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo de perro de raza Beagle. Se observó que cuanto mayor era el contenido en vitamina E en la lente de contacto más lenta y prolongada era la liberación del fármaco a lo largo del tiempo (Fig.1). En el caso de las lentes sin vitamina E se libera el 80% del fármaco en las primeras 4 horas mientras que pasa a 22 horas con 9% de vitamina E, hasta 84 horas con el 32% de vitamina E en las lentillas.

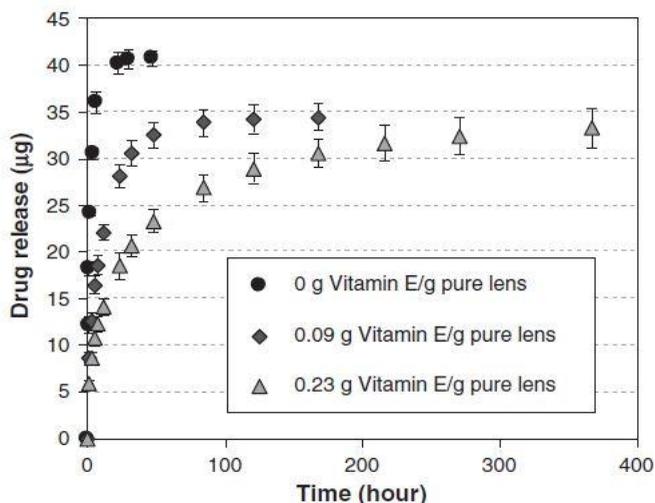


Figura 1. Liberación de maleato de timolol de la lente de contacto *in vitro* a lo largo del tiempo [6].

Se observó que en el modelo *in vivo* ocurría lo mismo y que había una correlación con la liberación del medicamento *in vitro*. *In vivo*, se conseguía reducir la presión intraocular en el ojo de los perros durante aproximadamente 48 horas, y se concluyó que las lentes de contacto impregnadas con maleato de timolol pueden ser un buen sistema para prolongar en el tiempo la administración del fármaco en el ojo, con una menor concentración de fármaco y un menor número de aplicaciones que con las gotas oftálmicas. Aun así, sigue ocurriendo una liberación no controlada durante las primeras horas del tratamiento por lo que este problema sigue sin solucionarse [6].

3.2. Lentes de contacto con un anillo de nanopartículas de etilcelulosa

Otro de los abordajes que se está estudiando es el uso de un anillo de nanopartículas cargado con el fármaco, que no modifique las propiedades ópticas ni físicas de las lentes de contacto. En este caso se prepararon nanopartículas con maleato de timolol por la técnica de doble emulsión. Se utilizaron cantidades crecientes de etilcelulosa en la fabricación de los anillos para ver su eficacia de encapsulación. Se hicieron experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* en este caso utilizando conejos. Las lentes de contacto con el anillo con mayor contenido en etilcelulosa mantuvieron la liberación del medicamento durante más tiempo (Fig. 2).

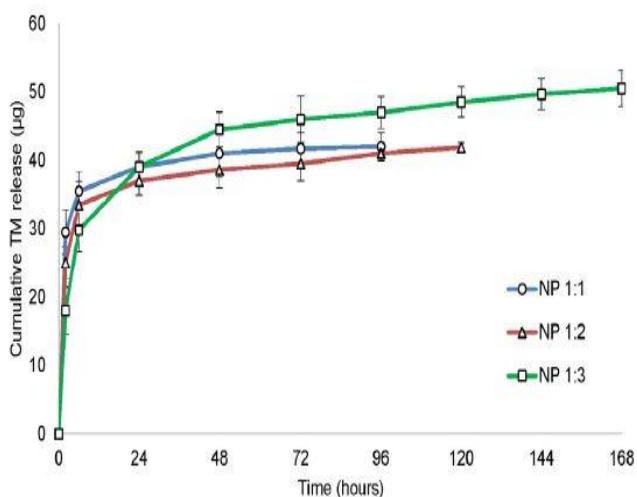


Figura 2. Liberación de maleato de timolol de la lente de contacto en el ensayo *in vitro* con diferentes concentraciones de etilcelulosa a lo largo del tiempo [4].

Lo mismo ocurre en el estudio *in vivo*, por lo que parece ser un buen método como candidato para poder aplicarlo a humanos. En este estudio se hicieron otros experimentos en cuanto al envasado y la esterilización de estas lentes de contacto cuyos resultados no fueron demasiado satisfactorios ya que en el proceso de envasado en medio acuoso, el producto perdía gran cantidad del fármaco en la nanopartícula por lo que habría que envasarlos en seco y rehidratarlos a la hora de usarlos, lo que añade un paso más al uso de estas lentes de contacto [4].

3.3. Lentes de contacto con nanogel de diamante

Otro de los estudios más recientes son las lentes de contacto con un nanogel de diamante integrado que se activan por la lisozima que se encuentra en el fluido lagrimal, desencadenando la liberación del medicamento de forma controlada (Fig. 3).

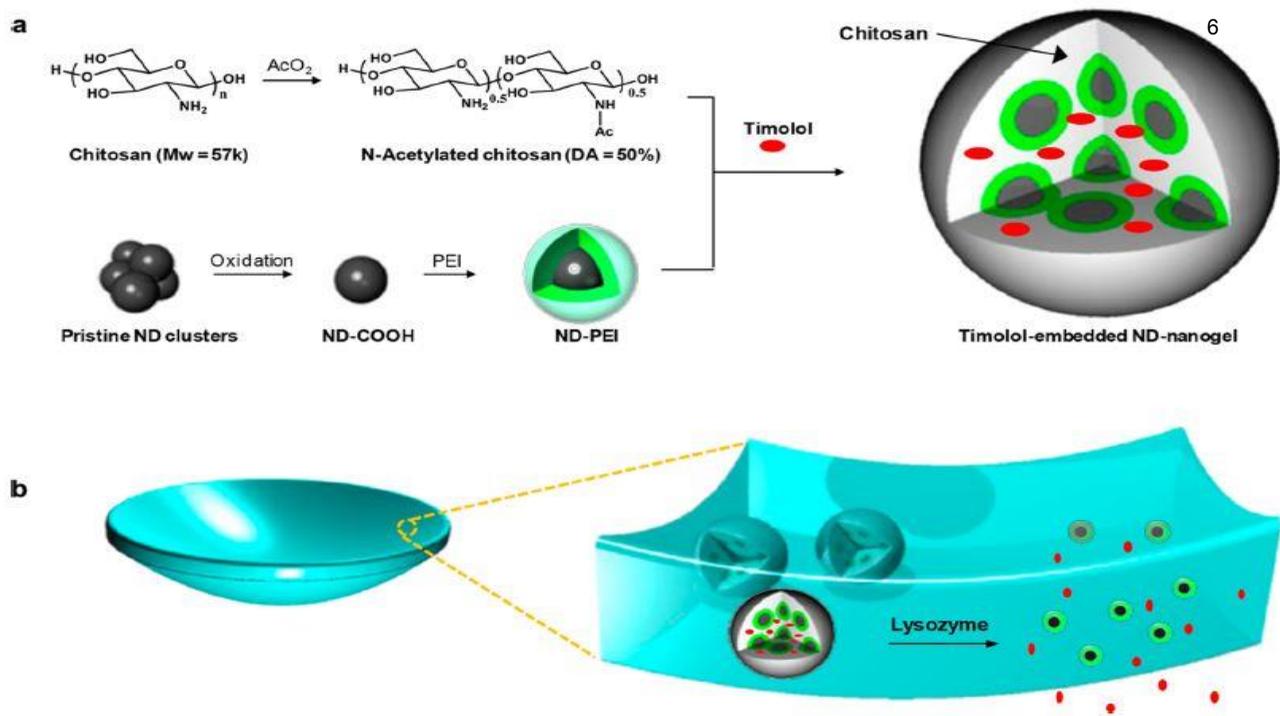


Figura 3. Ilustración de la lente de contacto con nanogel de diamante y su activación mediante la lisozima del fluido lagrimal [7].

Aunque este sistema está en las primeras fases de estudio, apunta a que puede ser viable tanto para este fármaco como para otros, debido a lo beneficioso de ser un sistema activado mediante una enzima por lo que se controla la liberación del fármaco. Los materiales utilizados pueden ser optimizados para la fabricación de estas lentes de contacto de forma terapéutica o incluso otros materiales liberadores de fármacos [7].

4. CONCLUSIONES

En este artículo se han comentado algunas de las opciones que se están estudiando actualmente en el tratamiento del glaucoma utilizando lentes de contacto. El uso de estas parece que ayuda a que se controle mejor, tanto temporal como espacialmente, la liberación del medicamento superando así algunas de las barreras encontradas hasta ahora en el tratamiento de la enfermedad.

La nanotecnología ha experimentado un auge en las últimas décadas, siendo uno de los campos en expansión y con gran potencial aplicado a la medicina, sobre todo en la administración de fármacos. El uso de distintos nanomateriales en diferentes aplicaciones como lentes de contacto todavía necesita ser estudiado en más profundidad para ver todos los efectos que puedan tener en humanos, ya que la mayoría de los estudios se han llevado a cabo *in vitro* o en modelos animales por lo que también serían necesarios ensayos clínicos. La optimización de los métodos de obtención de los nanomateriales también es necesaria para que sean estables en humanos y rentables como fármaco, pero no hay duda de que es necesario seguir ahondando en este tema.

REFERENCIAS

- [1] Glaucoma | National Eye Institute. <https://nei.nih.gov/health/glaucoma>
- [2] H. A. Quigley, "Number of people with glaucoma worldwide.," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 80, no. 5, pp. 389-393, 1996.
- [3] I. M. Carvalho, C. S. Marques, R. S. Oliveira, P. B. Coelho, P. C. Costa, and D. C. Ferreira, "Sustained drug release by contact lenses for glaucoma treatment - A review," *J. Control. Release*, vol. 202, pp. 76-82, 2015.
- [4] F. A. Maulvi *et al.*, "In vitro and in vivo evaluation of novel implantation technology in hydrogel contact lenses for controlled drug delivery," *J. Control. Release*, 2016.
- [5] Y. Diebold and M. Calonge, "Progress in Retinal and Eye Research Applications of nanoparticles in ophthalmology," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 29, no. 6, pp. 596-609, 2010.
- [6] C. C. Peng, M. T. Burke, B. E. Carbia, C. Plummer, and A. Chauhan, "Extended drug delivery by contact lenses for glaucoma therapy," *J. Control. Release*, vol. 162, no. 1, pp. 152-158, 2012.
- [7] H. J. Kim, K. Zhang, L. Moore, and D. Ho, "Diamond nanogel-embedded contact lenses mediate lysozyme-dependent therapeutic release," *ACS Nano*, 2014.

Marta Rojas Rodríguez recibió el título de Licenciada en Biología por la Universidad de Sevilla en 2013. Actualmente es estudiante del Máster en Biotecnología Sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide.

Adaptaciones de los organismos a las altas presiones del mundo abisal

Samuel P. Gorelli Godoy

Resumen—Existen multitud de adaptaciones a las altas presiones, pero hay una común, la producción de óxido de trimetilamina. Este compuesto permite el desarrollo de las estructuras celulares que sostienen la vida de los seres vivos. En función de la profundidad a la que viven los organismos y otras características, la capacidad de generar el óxido será distinta.

Palabras Claves— Óxido de trimetilamina, Presión, Abisal, Concentración, Profundidad.

1. INTRODUCCIÓN

Se le llama zona abisal a las franjas batipelágica y mesopelágica, que se encuentran entre los 1000 y 4000 metros de profundidad y entre los 4000 y 6000 metros de profundidad respectivamente. El mundo abisal está poblado por comunidades muy diversas de peces y otros organismos, tanto capaces de vivir tanto en el sedimento como en la columna de agua. Aparte de la ausencia de luz y de las bajas temperaturas, este lugar se caracteriza por una alta presión, que aumenta conforme descendemos en profundidad (1 atmósfera por cada 10 metros), si tenemos en cuenta que basta una presión de 7 Kilobares[1] para desnaturar la estructura de las proteínas, ¿Cómo es posible que existan peces bajo estas condiciones de altas presiones?.

Relación de la presión con la profundidad marina.

Profundidad (metros)	Atmósfera(s)
Nivel del mar	1
10	2
20	3
30	4
40	5
50	6
60	7
90	10
120	13
150	16

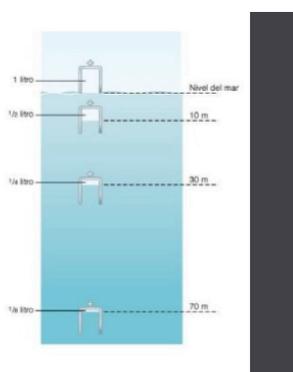


Figura 1: tabla en donde se representa el aumento de presión (atm) en relación a la profundidad (metros) [7]

2. ADAPTACIÓN AL MUNDO ABISAL

A lo largo de la filogenia, los seres vivos han desarrollado muchas adaptaciones para aguantar las las altas presiones de este ecosistema, algunos ejemplos son los cuerpos blandos y gelatinosos y huesos blandos (para reducir la

compresión a la que están sometidos), cuerpos pequeños con desarrollo dorsolateral (de esta manera evitan la compresión horizontal) o la ausencia de vejiga natatoria (a estas presiones requeriría un gran coste energético llenarla de gas). Pero la respuesta más común y que permite el desarrollo de las estructuras celulares es un compuesto llamado óxido de trimetilamina (OTMA), que se encuentra en las células musculares y de los órganos de los peces [2], [3], [4].

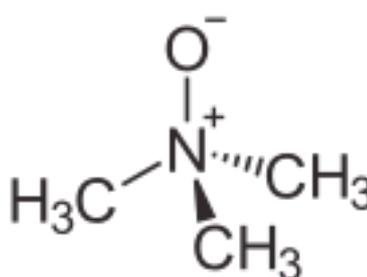


Figura 2: molécula de óxido de trimetilamina [8]

3. PRESIÓN Y OTMA

La presión como ya hemos dicho tiene un efecto desnaturador de la estructura proteica. Debido a esto muchos organismos han desarrollado adaptaciones de diverso tipo para poder aguantar la presión. Entre ellas se encuentran los piezolitos, que son solutos orgánicos que se incorporan a las proteínas y contrarrestan el efecto de la presión. El óxido de trimetilamina es un soluto orgánico que se puede encontrar en casi todos los peces marinos, crustáceos, etc. La OTMA mantiene un equilibrio osmótico que no solo sirve para tolerar la salinidad del agua, sino que también, mediante osmorregulación son capaces de impedir que la presión comprima la estructura de las proteínas.

De esta manera la concentración del compuesto mantiene una presión osmótica interna que contrarresta la presión hidrostática externa, permitiendo el desarrollo de la estructura de las moléculas (como el ADN por ejemplo, [4]). Además en comparación con otros solutos orgánicos es el compuesto más eficaz evitando la desnaturación de

las proteínas [4].

La OTMA también posee otro mecanismo para evitar la desnaturalización a grandes presiones. El Prof. Dominik Marx y su equipo [3] han estudiado el cambio en el espectro fotométrico del óxido a distintas presiones mediante espectroscopía y simulación por ordenador. Los resultados de sus experimentos muestran que a bajas presiones el compuesto forma tres enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua a su alrededor, mientras que a altas presiones forma cuatro puentes de hidrógeno con las moléculas que la circundan. Con este mecanismo, en las altas profundidades del mundo abisal, la OTMA al encontrarse en el interior celular formaría redes de 4 enlaces por cada molécula, manteniendo cohesionadas a las otras moléculas de alrededor (normalmente el líquido celular o intersticial si se encuentran en el exterior) permitiendo que las proteínas y moléculas mantengan su estructura.

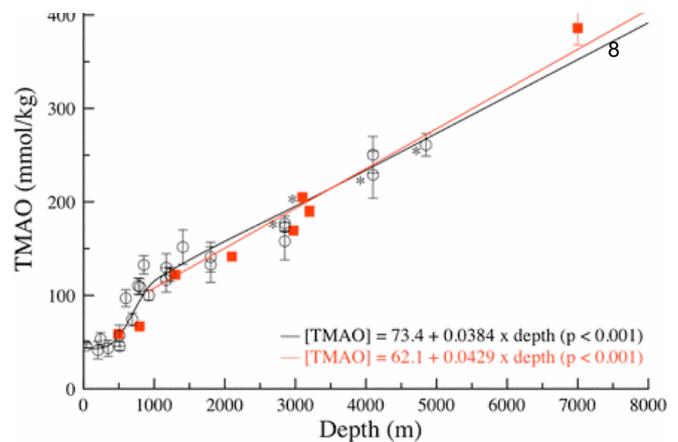
4. CONCENTRACIÓN DE OTMA Y PROFUNDIDAD

Como hemos visto antes, los organismos desarrollan una presión osmótica interna que se opone a la presión hidrostática externa, permitiendo la existencia de vida, pero la presión aumenta conforme aumenta la profundidad pese a la cual siguen existiendo comunidades de seres vivos. ¿Es posible que el compuesto OTMA genere mayor presión interna en función de su concentración?

Paul Yancey et al [2], capturaron ejemplares de dos especies de teleosteos (peces con esqueleto interno y vertebras) a distintas profundidades del océano y midieron la concentración de OTMA en los tejidos musculares. Obtuvieron la gráfica recogida en la figura 3. En ella podemos observar que conforme aumenta la profundidad (y por tanto la presión) aumenta la concentración del óxido. Con este resultado podríamos pensar que en función de las distintas presiones a las que se pueda ver sometido un espécimen, este desarrollará distintas concentraciones del compuesto.

Pero los organismos de estos ecosistemas tienen diferentes pautas de comportamiento, algunos ascienden a aguas más superficiales durante la noche para acceder a mayor alimento, otros son capaces de migrar por toda la columna de agua en busca de presas o de pareja, y otros tantos se pasan toda su vida haciendo muy pocos desplazamientos verticales en la columna de agua y se mantienen prácticamente a la misma profundidad siempre. Dado que para cada uno de estos patrones la presión varía de maneras distintas, la concentración del óxido que mantienen los organismos será distinta:

1) Especies con elevados rangos de migración en la columna de agua: estas especies necesariamente deberán tener la capacidad de variar la concentración en sus tejidos de OTMA, pudiendo aclimatarse [2] a distintas profundidades. Ejemplos de este patrón son los teleosteos,



que son capaces de descender hasta los 8.200 metros de profundidad [2]

Figura 3: relación entre la concentración de OTMA medida en individuos de dos especies diferentes (en milomoles por cada kilogramo de peso del espécimen) y profundidad (en metros) [2]

fundidad [2]

2) Especies que migran a aguas más superficiales temporalmente: cabría pensar que estos organismos tendrían capacidad para generar poca concentración de OTMA, ya que al migrar a zonas menos profundas durante períodos cortos de tiempo no necesitarán descender mucho, alejándose de las masas de agua que les sirven de alimento. Este es el caso de los peces linterna (*Myctophum affine*), un migrador vertical que durante la noche asciende para alimentarse.

3) Especies con pocos desplazamientos verticales: se podría pensar que los animales bentónicos o los que viven en la columna de agua pero no migran verticalmente, estarían adaptados a tener unas concentraciones concretas de óxido de trimetilamina en función de la profundidad en la que viven, y si abandonaran esta altura sus proteínas se desnaturalizarían (a no ser que como remancia evolutiva tuvieran la capacidad de variar la concentración de OTMA en sus tejidos). Un ejemplo de una especie que no migre verticalmente serían los famosos peces trípode (*Bathypterois viridensis*)

5. LÍMITE DE LA CONCENTRACIÓN DE OTMA

Por debajo de los 8.400 metros no se han encontrado especímenes, lo que evidencia la existencia de un límite a partir del cual los peces y otros organismos superiores no son capaces de aguantar la presión sin que sus proteínas se vean afectadas. Esto podría ser debido a la existencia de un límite fisiológico (una concentración máxima de óxido de trimetilamina) que no permita mayores descensos. Algunos estudios [5] indican que en seres humanos la presencia de grandes concentraciones de OTMA en sangre generan un mayor riesgo de ocurrencia de episodios cardiovasculares. Esto puede extrapolarse a los organismos abisales para explicar la existencia del ya mencionado límite fisiológico. Aunque esta teoría solo sirve para los organismos superiores, ya que recientemente se han descubierto arqueobacterias a 11000 metros de profundidad. Es el caso de *Pyrococcus CH1*, [6] descubierta en 2011

por científicos del instituto de Oceanografía de Xiamen. Los microorganismos del mundo abisal aún han sido muy poco estudiados, y se desconocen las adaptaciones que han desarrollado para aguantar las extremas condiciones de este ecosistema, por lo que solo se puede especular sobre la causa de su presencia en estas zonas.

Otra causa que podría explicar la desaparición de organismos superiores a partir de los 8200 metros, es simplemente que la poca densidad de población (muy baja comparada con aguas superficiales) sumado a que aún no se posee la tecnología adecuada para explorar estas zonas, hace que, todavía no se hayan encontrado ejemplares de nuevas especies en estas profundidades, y que no exista un límite fisiológico para la concentración de óxido de trimetilamina en los peces.

6. CONCLUSIONES

Como ya hemos visto las especies del ecosistema abisal han desarrollado muchas adaptaciones a las condiciones de presión de este, destacando la capacidad de producir óxido de trimetilamina, que a mayor concentración permite aguantar mayores presiones. Todavía no se están investigando los mecanismos exactos del compuesto, pero se puede establecer una correlación entre la existencia de seres vivos a cierta profundidad y la concentración del óxido en su cuerpo. Por desgracia la tecnología disponible para investigar este ecosistema aún está en desarrollo, y no se puede averiguar si hay o no un límite fisiológico que explique hasta donde llegar los organismos marinos (con excepción de algunos microorganismos como las arqueas).

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a Eva Donoso y a Javier Laynez su ayuda con la investigación y la redacción del artículo y a Aimar Ara Gregorio por la revisión del mismo.

REFERENCIAS

- [1] Vadim V. Mozhaev, Karel Heremans, Johannes Frank, Patrick Masson, and Claude Balny, "High Pressure Effects on Protein Structure and Function", *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 24:81-91 (1996)
- [2] Paul H. Yancey Mackenzie E. Geringer Jeffrey C. Drazen Ashley A. Rowden and Alan Jamieson "Marine fish may be biochemically constrained from inhabiting the deepest ocean depths"
- [3] Dominik Marx, Roland Winter and Roland Winter "The role played by solvents at extreme pressure. Combination of experiment and theory gives insights", No. 96 - Bochum, 30.06.2016
- [4] Satyajit Patra, Christian Anders, Nelli Erwin and Rolan Winter "Osmolyte Effects on the Conformational Dynamics of a DNA Hairpin at Ambient and Extreme Environmental Conditions", *Angewandte Chemie* · April 2017
- [5] W.H. Wilson Tang, Zeneng Wang, Bruce S. Levison, Robert A. Koeth, Earl B. Britt, Xiaoming Fu, Yuping Wu, and Stanley L. Haze, "Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk", *N Engl J Med* 2013; 368:1575-1584
- [6] "New Bacteria Species Found in Hadal Zone", *Softpedia*
- [7] R. Eduardo Hernandez Cardoza, "Fisiología del buceo a pro-

fundidad y otras situaciones hiperbáricas", Slideshare

[8] Artículo de Wikipedia: https://pt.wikipedia.org/wiki/N%C3%B3xido_de_trimetilamina

[9] Peter Castro y Michael E. Huber, *Biología Marina* 6ª Edición



Samuel Patricio Gorelli Godoy estudiante del Grado de Ciencias Ambientales por la Universidad Pablo de Olavide y alumno interno del área de ecología de la misma.

Uso terapéutico de los anticuerpos monoclonales: gran avance en la práctica clínica

Carmen Espejo Serrano

Resumen— 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 Claves— Anticuerpo monoclonal, Enfermedad, Inhibición, Receptor, 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 (infiximab 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]

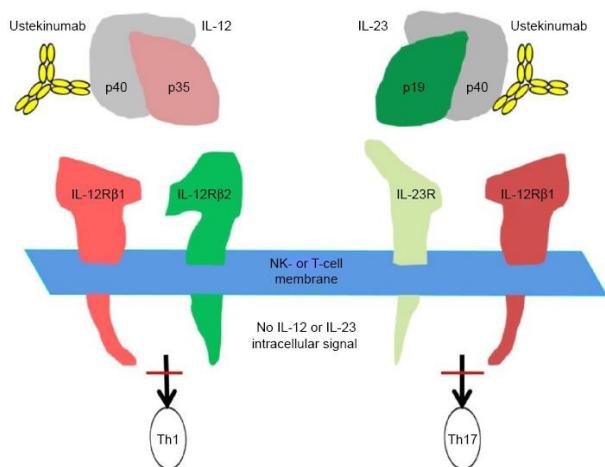


Fig 1. Modo de acción de ustekinumab [3].

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 Fc γ Rs 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 EGF y del factor de crecimiento de tumores (TGF α) 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 neovas-

cular age-related macular degeneration: results from the RABIMO trial. *Graefes 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.



Carmen Espejo Serrano, estudiante de 4º de Biotecnología.

TLOs: Cuando el sistema inmune se asienta en el campo de batalla

David Cabrerizo Granados, Alina Georgiana Ioja

Resumen— Los órganos linfoides terciarios son estructuras que surgen en lugares de inflamación crónica y desaparecen cuando esta señal remite. En este artículo hablaremos sobre su estructura, así como sobre su papel y función en el organismo, con especiales miras hacia las enfermedades inflamatorias crónicas, concretamente el cáncer.

Palabras Claves— TLOs, SLOs, microambiente tumoral.

1. INTRODUCCIÓN

Los órganos linfoides se clasifican generalmente, en órganos linfoides primarios, tales como el timo y la médula ósea, encargados de la producción de linfocitos T y B específicos de receptores, respectivamente; y en órganos linfoides secundarios, tales como los ganglios linfáticos, el bazo y las amígdalas, en los que los linfocitos se expanden debido a la exposición al antígeno, produciendo células T de memoria y células B efectoras, dando como resultado células plasmáticas. No obstante, existe un tercer tipo denominado órgano linfoide terciario, el cual presenta características peculiares [1].

Las estructuras linfoides terciarias, también llamados órganos linfoides terciarios (TLOs), han sido descritos en prácticamente todos los órganos y tejidos del cuerpo. Al contrario de los órganos linfoides primarios y los secundarios (SLOs), los TLOs no aparecen en circunstancias ontogénicas. Éstos pueden aparecer durante el desarrollo postnatal del individuo en aquellas áreas que experimenten situaciones de inflamación crónica, con una amplia activación de la respuesta inmune humoral y celular. [2] Una de sus principales características es la gran plasticidad con la que cuentan, ya que se generan en un contexto inflamatorio, llegando a desaparecer una vez que el foco inflamatorio se extingue. No se desarrollan en localizaciones específicas y comunes entre individuos, [3] y su alta plasticidad junto a su tardía edad, determinan el uso de una terminología precisa para los inmunólogos. [4]

2. ESTRUCTURA DE LOS TLOS

Los TLOs quedan definidos por su estructura, composición celular, expresión de quimioquinas y soporte vascular y estromal, aunque éstas sean características similares a las de los SLOs. Entre sus componentes característicos están [1]:

- Zona de linfocitos T Región de linfocitos B proliferativos. Centro germinal de células dendríticas. Todas éstas son las células clave en los TLOs, capaces de reconocer y atacar a componentes que

puedan poner en riesgo al organismo.

- Los fibroblastos inflamatorios, los cuales presentan un perfil de expresión similar a de los órganos linfoides clásicos. Estos fibroblastos forman una estructura reticular que genera pequeños conductos que sirven de vías para transmitir señales como quimioquinas o antígenos, todas ellas de bajo peso molecular.
- Vasos sanguíneos y linfáticos. Estas estructuras permiten la comunicación del TLO con el resto del organismo. Concretamente, una de las características con las que cuentan es la presencia de gran vénulas endoteliales (HEV), las cuales son propias de tejidos linfoides. Éstas permiten el paso de linfocitos circulantes en la sangre a los TLOs para su posterior activación. Además, los HEVs localizados alrededor de los TLOs sugiere que el microambiente representa una entrada ideal para los linfocitos, un paso crítico para el inicio de la respuesta inmune adaptativa, como se observa en los SLOs.

Los TLOs se suelen desarrollar en tejidos inicialmente no linfoides, asociados a situaciones como infecciones crónicas, rechazo crónico de injertos y órganos trasplantados, enfermedades autoinmunes y multitud de cánceres sólidos. Con respecto a ello, es necesario distinguir dos tipos de TLOs: fisiológicos y patológicos (Fig.1).

En el primer caso, la aparición de éstos está provocada por una exposición antigénica constante en el tiempo. Éstos suelen estar asociados a la mucosa, de ahí su denominación como MALT.

En el segundo caso, aparecen por enfermedades autoinmunes. En ellos el sistema de vías linfáticas es dudoso [4].

3. FUNCIÓN DE LOS TLOS

La principal función de los TLOs a nivel celular se basa en mantener una población de linfocitos a un nivel estructural adecuado para que se pueda llevar a cabo correcta-

mente una respuesta inmune adaptativa en los tejidos afectados. En este sentido, las distintas poblaciones de células mesenquimales activadas juegan un papel muy importante, ya que adquieren características similares a los fibroblastos linfoides en los SLOs. Sin embargo, la maduración de los fibroblastos en TLOs, a diferencia de SLOs, depende potencialmente de distintos factores como el tejido afectado o el microambiente inflamatorio. Además, el nivel de organización no llega a ser tan alto como aquellos regulados en SLOs [5].

Los TLOs presentan un papel en la respuesta inmune similar al de los órganos linfoides secundarios [8]. Sin embargo, sus funciones van a depender de múltiples factores, tales como su localización, el estímulo que los haya generado, la cinética de inflamación y la activación celular producida. Hay casos en los que pueden jugar un papel deletéreo para el transcurso de ciertas enfermedades autoinmunes, como sería el caso de los enfermos de artritis reumatoide. Se piensa que la incapacidad de controlar específicamente la recirculación leucocitaria en los TLOs o la ausencia de gradientes de quimioquinas específicamente regulados en éstos para posicionar óptimamente los linfocitos a nivel estructural, pueden ser factores relevantes que pueden provocar que estos tejidos contribuyan al desarrollo de enfermedades autoinmunes inflamatorias [5].

Sin embargo, en otros casos pueden desempeñar un papel beneficioso, como ocurre en múltiples tipos de cáncer [6].

4. TLO EN TUMORES

La presencia de TLOs se ha detectado en numerosos tipos de tumores sólidos. Dichos TLOs manifiestan una abundante variabilidad en densidad y organización celular, lo cual indica que la naturaleza del microambiente tumoral es crítico para la neogénesis linfoide. [2][7]

Cuando los TLOs aparecen en el contexto de enfermedad neoplásica, pueden localizarse intratumoralmente o peritumoralmente. La localización intratumoral es mucho menos frecuente que la peritumoral, si bien es cierto que su presencia depende, fundamentalmente, del tipo de tumor y el origen del tejido que presenta la transformación neoplásica. La mayor parte de los TLOs suelen presentarse en zonas peritumorales, concretamente en el margen invasivo rodeando el tumor, aunque también se dan en zonas ligeramente más alejadas, pero siempre dentro del área de invasión del tumor [8]. Esto se debe, básicamente, al hecho de que el tumor sólido genera, por regla básica, una cápsula de fibroblastos activos alrededor de la masa tumoral con el fin de protegerla de agentes atacantes y contraproducentes para ella. Por ello, los TLOs tienden a encontrarse en dichas áreas.

La actividad de los TLOs en las áreas tumorales se puede resumir en tres grandes etapas [9]:

1. Reclutaje de linfocitos T y B en los TLOs gracias a la actividad de quimioquinas secretadas por los

TLOs y por el microambiente tumoral.

2. Diferenciación, proliferación y activación de linfocitos T efectores. Activación de linfocitos B en células plasmáticas.
3. Migración de los linfocitos T efectores generados por el TLO con el fin de atacarlos por desgranulación, activación del sistema del complemento y por citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Al determinar el contexto inmunológico local, los TLOs pueden intervenir en la modulación de tumores sólidos. [2] Por ejemplo, en casos de cáncer de mama, pulmón o colon, la presencia de estos TLOs se ha vinculado a un pronóstico favorable del paciente. Sin embargo, en otros casos, como en los carcinomas metastásicos renales, su presencia está relacionada con un pronóstico desfavorable. Esta diferencia de actuación ante la actividad neoplásica se debe a que el microambiente tumoral, y con ellos los TLOs, cuentan con numerosas características inmunosupresivas, tales linfocitos T reguladores, macrófagos de tipo M2 o células supresoras mieloides. Por lo tanto, los TLOs pueden actuar como un arma de doble filo, atacando contra el tumor e impidiendo su destrucción, el cual es el equilibrio inmunogénico [9].

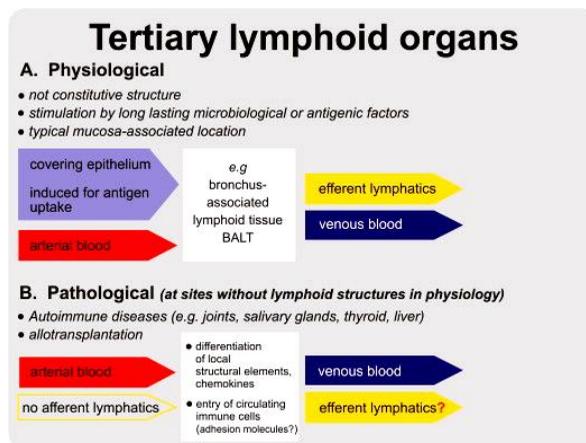


Fig. 1. Órganos linfoides terciarios "fisiológicos" y patológicos". [4]

5. CONCLUSIONES

Tal y como se ha comprobado a lo largo de los últimos años, el Sistema Inmune juega un papel fundamental en nuestra salud, tanto siendo nuestro amigo como enemigo. Es por ello, que su presencia concreta en lugares del organismo donde se desarrollan procesos inflamatorios supone un aspecto a más que tener en cuenta.

Por ejemplo, la neogénesis linfoide podría ser objeto de estudio con el fin de incrementar la inmunidad antitumoral en pacientes con cáncer. Además, los TLOs podrían emplearse como biomarcadores para pacientes con cáncer, con el fin de proporcionarles un pronóstico clínico de supervivencia, recaída y metástasis apropiado para cada caso específico. Sólo con la investigación y el análisis

clínico de ellos podremos llegar a estar más cerca de curas a enfermedades complejas y feroces como el cáncer.

REFERENCIAS

- [1] Sharon Stranford, NancyH.Ruddle. *Follicular dendritic cells, conduits, lymphatic vessels, and high endothelial venules in tertiary lymphoid organs: parallels with lymph node stroma*. Front Immunol. 2012 Nov 22; 3:350.
- [2] Goc J, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Dieu-Nosjean MC. *Characteristics of tertiary lymphoid structures in primary cancers*. Oncoimmunology. 2013 Dec 1;2(12):e26836. Epub 2013 Oct 22.
- [3] Ruddle NH. *High Endothelial Venules and Lymphatic Vessels in Tertiary Lymphoid Organs: Characteristics, Functions, and Regulation*. Front Immunol. 2016 Nov 9;7:491. eCollection 2016.
- [4] Reinhard Pabst, *Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. What are the criteria to call a lymphoid organ primary, secondary or tertiary?* Department of Functional and Applied Anatomy, Medical School of Hannover, 26 June 2007
- [5] Barone F, Gardner DH, Nayar S, Steinthal N, Buckley CD, Luther SA. *Stromal Fibroblasts in Tertiary Lymphoid Structures: A Novel Target in Chronic Inflammation*. Front Immunol. 2016 Nov 8;7:477. eCollection 2016.
- [6] Myriam LAWAND, PhD. *Structure Lymphoïdes tertiaires et cancer*. Laboratoire "Cancer et Immunité anti-tumorale" UMRS 1138 INSERMO, Centre de Recherche des Cordeliers.
- [7] Sautès-Fridman C, Lawand M, Giraldo NA, Kaplon H, Germain C, Fridman WH, Dieu-Nosjean MC. *Tertiary Lymphoid Structures in Cancers: Prognostic Value, Regulation, and Manipulation for Therapeutic Intervention*. Front Immunol. 2016 Oct 3;7:407. eCollection 2016.
- [8] Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R. *Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Tissues*. Front Immunol. 2016 Jun 22; 7:244. doi: 10.3389/fimmu.2016.00244. eCollection 2016.
- [9] Dieu-Nosjean MC, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH. *Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond*. Trends Immunol. 2014 Nov; 35(11):571-80.



David Cabrerizo Granados, estudiante predoctoral en el Instituto de Investigación del Hospital del Mar en el Grupo de Transición Epitelio-Mesenquimal y Progresión Tumoral.

Alina Georgiana Ioja, estudiante del 4º curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide.

Como coautores, nos complace mencionar a **Alejandro Belmonte Fernández**, estudiante del Master de Investigación Biomédica en la Universidad de Sevilla y a **Daniel Jesús García García**, estudiante del 4º curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. Becario de colaboración en el Departamento de Anatomía, Fisiología y Biología Celular en el CABD.

Aplicaciones de la espectroscopía Raman para el estudio del arte rupestre

Joan Escudé González

Resumen—La intervención y preservación del arte rupestre ha supuesto desde mediados del siglo pasado un reto para la conservación. La gran importancia y delicadeza de estas muestras del arte del paleolítico hacen imprescindible su estudio y caracterización mediante técnicas analíticas no destructivas. Dichas técnicas nos pueden proporcionar información muy diversa y de gran importancia para conocer los métodos y la cronología de estas primitivas expresiones artísticas.

Palabras Claves— Espectroscopía Raman, Arte rupestre, Análisis composicional, Pigmentos naturales.

1. INTRODUCCIÓN

Nuestro país posee una gran riqueza de testimonios de arte parietal prehistórico de excepcional importancia histórico-artística y gran parte de ellos han sido reconocidos como patrimonio de la humanidad por la UNESCO (Fig. 1). Es por eso que su conservación ha supuesto un reto de primer orden desde las últimas décadas del siglo XX y, debido a su, generalmente, delicado estado de conservación, cada vez es más importante el desarrollo de técnicas no destructivas para su caracterización material, datación, autenticación y conservación.

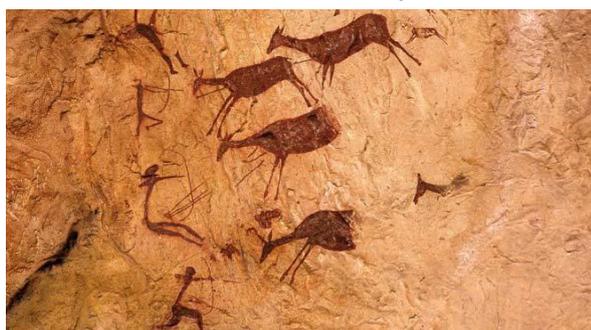


Fig. 1. Pinturas rupestres de arte levantino de la Cueva de los Caballos de Valltorta en el municipio de Tírig (Castellón), incluidas en la lista de patrimonio mundial de la UNESCO en 1998 dentro del "Conjunto del arte rupestre del arco mediterráneo en la Península Ibérica". Fotografía: www.españaescultura.es

2. ESPECTROSCOPIA RAMAN

La espectroscopía Raman es una técnica analítica que proporciona información composicional, esto es, nos sirve para identificar los compuestos químicos presentes en la muestra. Se trata de una de las conocidas como espectroscopías vibracionales, pues basa su principio de detección en las diferentes transiciones de energía que se producen cuando determinados grupos funcionales vibran al excitarlos mediante una fuente energética. Generalmente esta energía es la producida por un haz de luz láser y si la luz dispersada por las moléculas en vibración es recogida por

un microscopio acoplado podemos hablar también de microscopía Raman.

Es una técnica no destructiva y sin contacto que puede realizarse *in situ*, sin embargo, en ocasiones en las que se debe extraer muestra para datación o para otras técnicas analíticas, se puede aprovechar para examinar esa muestra mediante Raman en el laboratorio. Por norma general los equipos de laboratorio gozan de mayor precisión y de la posibilidad de disponer de más de una fuente láser, hecho que puede ser muy ventajoso si se quieren analizar compuestos de naturaleza diversa. No obstante, hoy en día los equipos portátiles son cada vez de mayor calidad y precisión y nos permiten multiplicar el número de áreas que pueden ser analizadas así como investigar elementos que no pueden ser trasladados o de los que no podemos extraer muestras [1]. Además, su tamaño cada vez más reducido permite alcanzar zonas antes inaccesibles o complementar los análisis de otras técnicas con equipos portátiles de mayor envergadura [2].

Es importante tener en cuenta que se trata de una técnica de análisis puntual, que limita su radio de detección a superficies de unos $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ [1], [3], por lo que, para poder extraer conclusiones representativas, es importante poder realizar numerosas mediciones en varios puntos diferentes de las figuras.

Como fuente de excitación pueden usarse láseres de varios tipos como el de helio-neón, que genera luz roja de 633 nm [3], [4], [5], [6]; el de Neodimio:YAG, operando con luz verde a 532 nm [1], [6]; el de argón, de haz verde azulado de 514 nm [7]; incluso láseres de excitación cercana al infrarrojo de 785 nm [2], [6]. La fuente de luz usada puede influir en la sensibilidad de la técnica analítica: por norma general se dice que los láseres de espectro rojo son mejores para el análisis de muestras orgánicas, mientras que los verdes son más precisos para las muestras de carácter inorgánico como rocas, minerales o morteros.

En cuanto a la potencia del haz láser, debe tenerse en cuenta la posibilidad de que un rayo demasiado energético pueda degradar la muestra por deshidratación o por choque térmico, por eso se utilizan filtros de densidad que limitan las potencias en el rango desde 30mW a 286 μW [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7].

3. IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS

El principal uso de la espectroscopía Raman en el ámbito de la pintura rupestre es la determinación de la naturaleza de los pigmentos utilizados, así como la detección de la posible existencia de aglutinantes.

Además, en el caso de pigmentos minerales, se pueden recopilar mediciones de otros compuestos extraídos de posibles lugares de origen para comparar sus espectros con las muestras y poder determinar si fueron extraídos de esas mismas fuentes cercanas o de otros lugares, e incluso plantear si diversas figuras fueron pintadas en diferentes periodos de ocupación [1], [2], [6].

La paleta de colores existente en el periodo paleolítico no era muy extensa. Se limitaba a tonos rojos, marrones, ocre y negros [2]. En casos aislados se ha documentado también el uso de pigmento blanco y negro azulado [3].

3.1. Colores negros

Los pigmentos negros usados comúnmente en pintura rupestre son o bien de origen mineral, como los óxidos y oxihidróxidos de manganeso, o bien producto de la combustión de materiales orgánicos como hueso, marfil, madera (carbón y hollín), etc. Estos pigmentos que contienen carbono en su composición son especialmente interesantes porque pueden posibilitar la datación directa de las pinturas mediante análisis por radiocarbono (^{14}C). Por su parte los óxidos de manganeso también pueden aportar información significativa acerca de su procedencia mediante el análisis de su naturaleza y microestructura, lo que podría ser indicativo de diferentes aspectos de comportamiento humano en la prehistoria [1].

La detección de carbono amorfo viene representada en los espectros Raman por bandas a 1390 y 1590 cm^{-1} , lo que nos indica el uso de negro de carbón [1], [2], [4], [5].

La detección de los óxidos de manganeso en forma de pirolusita (MnO_2), hausmanita, ramsdellita, romanechita u otros, viene representada por bandas a 580 y 650 cm^{-1} [1], [6].

En el caso de estos pigmentos negros, es necesario también observar si aparece una característica banda en aproximadamente 960 cm^{-1} que denota la presencia de grupos fosfato para que podamos identificar el uso de negro de hueso o negro marfil, compuestos principalmente por hidroxiapatito ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [1], [2], [4], [5].

En ocasiones se han detectado restos de fosfatos en pigmentos de otros colores, lo que puede explicarse en caso de que se hubieran usado herramientas de hueso para pintar o para moler lo pigmentos o bien que las recetas de preparación incluyeran una proporción de huesos calcinados en las mezclas pigmentarias, quizá como parte de algún ritual [3].

3.2. Colores rojos y otras tierras

Se trata de compuestos principalmente de óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos de hierro en diferentes estados de hidratación.

En los colores rojos generalmente se detecta la presencia de óxido férrico en forma de hematita (Fe_2O_3) que presenta unas características bandas a 289 , 408 , 495 y 608 cm^{-1} en los espectros Raman [2], [4], [5] (Fig. 2).

En los tonos ocre amarillos se detecta la presencia de goethita, óxido de hierro hidratado que puede identificarse por sus bandas en 297 , 384 , 477 y 545 cm^{-1} [2] (Fig. 2).

Son escasos los casos en los que se usan arcillas blancas para el arte parietal pero investigadores como Hernanz *et al.* [3] han documentado el uso de anatasa, un óxido de titanio (TiO_2) blanco para el dibujo de detalles y relieves sobre figuras dibujadas con otros colores. Su uso, no obstante, está probablemente condicionado por la casualidad y su fácil disposición en esa zona en particular.

4. DIAGNOSIS DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN

Además de la identificación de los pigmentos, la espectroscopía Raman también nos puede servir para analizar el sustrato rocoso donde se encuentran las pinturas [4]. Esto, además de proporcionarnos información composicional acerca de la roca, nos permitirá conocer el espectro del sustrato para poder distinguirlo de la señal de la capa pictórica en caso de que esta sea de poco grosor y los espectros de ambas capas se superpongan [1], [2].

Un sustrato muy común en cuevas es por ejemplo la calcita, que puede ser fácilmente identificable por su intenso pico a 1085 cm^{-1} y otros menores en 280 y 712 cm^{-1} [1], [2], [5] (Fig. 2). El cuarzo, componente principal de los sustratos de roca arenisca, se puede identificar por una banda a 466 cm^{-1} [3].

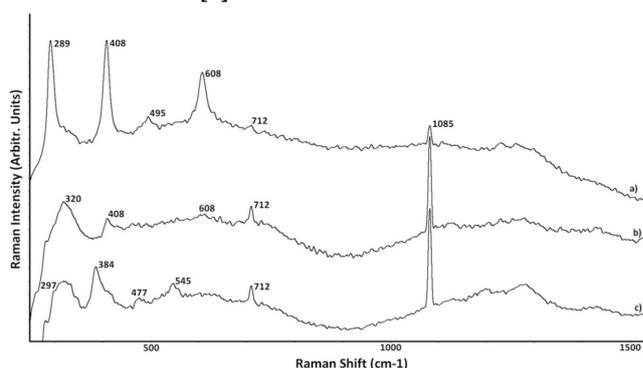


Fig. 2. Espectros Raman de diferentes óxidos de hierro: a) hematita, óxido rojo; b) especie intermedia de óxido de hierro rojo deteriorado; c) goethita, óxido de hierro característico en zonas amarillas. En todos los espectros se detecta la presencia de carbonato de calcio del sustrato, lo que denota el poco espesor de la capa pictórica. [2]

En lo referente a los factores biológicos de degradación, la presencia de carotenoides, que vendrán determinados por bandas en 1155 , 1510 y 1008 cm^{-1} , puede indicar la presencia de líquenes, hongos o cianobacterias en la superficie rocosa [1], [2], [3]. Por su parte, la presencia de nitratos nos indica una posible degradación de origen biológico por deyecciones de murciélagos [4].

Las cuevas son ecosistemas donde proliferan hongos y bacterias y la presencia de visitantes puede aumentar aún más la colonización microbiana y convertirse en un problema de conservación para el arte parietal. Martín-Sánchez *et al.* [7], por ejemplo, presentan un caso en la cueva de Lascaux donde se utilizó la espectroscopia Raman para identificar el agente biológico causante de una mancha negra de origen desconocido sobre las pinturas. Gracias a la técnica Raman se identificaron los compues-

tos de la melanina fúngica generada por un hongo que a su vez era dispersada por unos pequeños artrópodos colémbolos que se alimentaban de éste pero no procesaban la melanina, que se conservaba y extendía con sus restos fecales.

5. DATACIÓN

La espectroscopía Raman no es una técnica de datación directa, sin embargo, existen ciertas características especiales que pueden posibilitar una datación si se cumplen una serie de condiciones determinadas.

En primer lugar y como hemos comentado anteriormente, la detección de pigmentos de base carbono puede abrir la posibilidad de realizar una datación absoluta mediante análisis de carbono-14 [1].

Otra posibilidad de datación se abre con la detección y análisis de costras de oxalatos de calcio. Los oxalatos son ésteres derivados del ácido oxálico y están relacionados con los procesos metabólicos de hongos y líquenes. Los oxalatos en forma de whewellita ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) pueden identificarse con bandas en 895, 1461, 1487 y 1627 cm^{-1} en los espectros Raman. Así pues, la presencia de costras de oxalatos sobre la capa pictórica abre una nueva posibilidad de análisis mediante radiocarbono que, si bien no nos puede decir cuando fueron realizadas las pinturas, sí que nos puede proporcionar una datación *ante quem*, es decir, una cronología a partir de la cual ya es seguro que esas policromías existían en ese sustrato. Aún es más, en ocasiones, si es posible extraer una muestra y realizar una lámina delgada de los estratos pictóricos, comprobaremos que la capa de policromía se encuentra entre dos estratos de oxalatos, lo que nos permitirá, analizando ambas capas por carbono-14, el establecimiento de dataciones *post quem* y *ante quem* [3], [5] (Fig. 3).

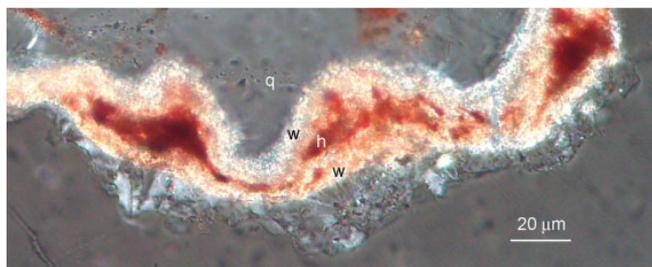


Fig. 3. Microestratigrafía observada al microscopio con luz polarizada de una sección delgada de una capa de pigmento rojo identificada como hematita (h) entre dos capas de oxalatos en forma de whewellita (w) sobre un sustrato de cuarzo (q). [3]

6. CONCLUSIONES

La espectroscopía Raman es una técnica no destructiva que aporta valiosa información por sí misma y como complemento a otras técnicas analíticas. Su capacidad para analizar tanto sustancias orgánicas como inorgánicas la hace una opción muy interesante para conocer materiales de carácter natural como los usados en las pinturas rupestres.

El desarrollo de equipos portátiles de gran precisión y versatilidad abre nuevas posibilidades para los análisis *in*

situ. Además, sus mediciones se ven poco influidas por las condiciones climáticas no siempre favorables que podemos encontrar en ambientes subterráneos o kársticos (humedad muy alta y temperatura relativamente baja) y no se requiere ningún tratamiento de la zona o de la muestra previamente a la realización del análisis.

REFERENCIAS

- [1] S. Lahlil, M. Lebon, L. Beck, H. Rousselière, C. Vignaud, I. Reiche, M. Menu, P. Paillet, and F. Plassard, "The first *in situ* micro-Raman spectroscopic analysis of prehistoric cave art of Rouffignac St-Cernin, France," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 43, no. 11, pp. 1637-1643, 2012.
- [2] M. Olivares, K. Castro, M. S. Corchón, D. Gárate, X. Murelaga, A. Sarmiento, and N. Etxebarria, "Non-invasive portable instrumentation to study Palaeolithic rock paintings: The case of La Peña Cave in San Roman de Candamo (Asturias, Spain)," *Journal of Archaeological Science*, vol. 40, no. 2, pp. 1354-1360, 2013.
- [3] A. Hernanz, J. M. Gavira-Vallejo, J. F. Ruiz-López, and H. G. M. Edwards, "A comprehensive micro-Raman spectroscopic study of prehistoric rock paintings from the Sierra de las Cuerdas, Cuenca, Spain," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 39, no. 8, pp. 972-984, Aug. 2008.
- [4] A. Hernanz, M. Mas, B. Gavilán, and B. Hernández, "Raman microscopy and IR spectroscopy of prehistoric paintings from Los Murciélagos cave (Zuheros, Córdoba, Spain)," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 37, no. 4, pp. 492-497, 2006.
- [5] A. Hernanz, J. F. Ruiz-López, J. M. Gavira-Vallejo, S. Martin, and E. Gavrilenko, "Raman microscopy of prehistoric rock paintings from the Hoz de Vicente, Minglanilla, Cuenca, Spain," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 41, no. 11, pp. 1394-1399, Nov. 2010.
- [6] M. Sepúlveda, S. Gutiérrez, M. C. Vallette, V. G. Standen, B. T. Arriaza, and J. J. Cárcamo-Vega, "Micro-Raman spectral identification of manganese oxides black pigments in an archaeological context in Northern Chile," *Heritage Science*, vol. 3, no. 1, p. 32, 2015.
- [7] P. M. Martin-Sanchez, S. Sanchez-Cortes, E. Lopez-Tobar, V. Jurado, F. Bastian, C. Alabouvette, and C. Saiz-Jimenez, "The nature of black stains in Lascaux Cave, France, as revealed by surface-enhanced Raman spectroscopy," *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 43, no. 3, pp. 464-467, Mar. 2012.



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.

Conservación Preventiva aplicada a material orgánico de origen antropológico

Irene Roncero Pérez

Resumen— Como parte de nuestro patrimonio histórico nos encontramos en España con colecciones de momias de diferente origen: egipcias, guanches o americanas. Todas ellas conforman un grupo de materiales de carácter orgánico muy frágil que tiene en la conservación preventiva la mejor herramienta para su preservación.

Palabras Claves— Conservación Preventiva, Momias, Monitorización, Parámetros Medioambientales.

1. INTRODUCCIÓN

La conservación preventiva es una disciplina que está relacionada con el entorno del objeto a conservar, por tanto su metodología de actuación no implica la intervención directa sobre el mismo sino un trabajo sistemático que identifique, evalúe, controle y gestione los riesgos de deterioro con el fin de eliminarlos o minimizarlos [1], [2], [3]. Los problemas tienen, en general, un origen externo al bien y la conservación preventiva se ha centrado desde su desarrollo en controlar el medio, en relación a valores de humedad y temperatura, control de la luz, la polución o ya de índole antropogénica de luchar contra el robo, el fuego, el vandalismo así como tareas de prevención en la logística, el embalaje y el transporte [4]. Todo ello dependerá del bien sobre el que apliquemos la metodología y del riesgo de deterioro en cuestión.

En el ámbito de los museos la conservación preventiva se ha centrado fundamentalmente en parámetros medioambientales (microclima, luz y radiaciones asociadas y contaminantes) y agentes biológicos. El diagnóstico se complica si tenemos en cuenta que la mayoría de estas instituciones están ubicadas en edificios históricos y con una colección que en general es muy heterogénea materialmente hablando. Para una correcta planificación es necesario conocer a fondo las características materiales de la colección así como el medio exterior e interior de la institución y los riesgos potenciales de degradación.

En este artículo pasamos a analizar las colecciones de material orgánico de origen antropológico, momias fundamentalmente, que forman parte de nuestro patrimonio histórico-cultural dentro de las instituciones museísticas. Se trata de un material frágil cuya conservación depende de muchos factores, como su interacción con el medio durante su enterramiento, pero con especial trascendencia de los procesos fisicoquímicos y biológicos que se producen en el entorno, de ahí la importancia de una correcta metodología de monitoreo y conservación preventiva [4].

2. CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN DE UNA MOMIA

La momificación es un proceso en el que no tiene lugar

la degradación de un cadáver o tiene lugar parcialmente, con una desecación de los tejidos inmediata a la muerte [5]. Ésta puede producirse por diversos procesos, en algunos casos por interacción con el medio, siendo los más habituales por disminución hídrica (secado al aire y desecación salina), procesos térmicos (ahumado, crioconservación y congelación) y procesos de curtido (característico de zonas pantanosas) [4]. Por otra parte, en antropología se identifican tres tipos de momias:

- *Momias espontáneas*, cuando la momificación se produce de forma natural resultado de las características del entorno, favoreciendo la desecación. Este tipo se produce en zonas de climas extremos, bien áridas bien frías, o con condiciones de ausencia de oxígeno y gran acidez [5], [6].
- *Momias por procesos espontáneos favorables*, buscando intencionadamente las condiciones en las cuales se producía la momificación. Ejemplo de ello son las momias predinásticas egipcias enterradas en las arenas del desierto [5], [6].
- *Momias antropogénicas*, que fueron sometidas a una práctica que daba como resultado una momificación artificial. Estas suponen casi el 95% de las momias conocidas, siendo las referencias más antiguas las realizadas en la cultura Chinchorro en la costa de Chile entorno al 5000 a.C., y por supuesto las momificaciones realizadas por la cultura egipcia (figura 1) implantadas de manera artificial desde el Imperio Antiguo, alcanzando su máximo desarrollo en el Imperio Nuevo [5], [6].

Un cuerpo momificado ha perdido todo el contenido de agua de sus tejidos, siendo el agua aproximadamente el 60% del peso total de un adulto (agua intracelular -40%- y agua extracelular -20%-). Una vez desarrollado el proceso de desecación el cuerpo humano queda compuesto por un 30% de tejido blando, entre otros elementos proteínas (queratina, colágeno) y grasas, y el 70% restante lo conforma el tejido óseo y la matriz extracelular (con componentes orgánicos, entre un 30-35%, e inorgánicos 65-70%) [6], [7]. Así, podemos considerar que alrededor de un 60% de los componentes de una momia son orgánicos, teniendo en cuenta únicamente los tejidos blandos y óseos [6].

Además, debemos tener en cuenta otros elementos que forman parte de la momia, como los vendajes de lino de algunas momias egipcias (fibra natural compuesta en un 70% de celulosa), pieles de animales o piezas de ajuar [6], [8].



Fig. 1. Exposición de momia egipcia en el Museo Arqueológico Nacional. Fuente [8].

3. PARÁMETROS MEDIOAMBIENTALES A CONTROLAR

La conservación de los restos momificados dependerá del tipo de momificación pero también, y de manera definitiva, de las condiciones ambientales en las que se exhiba o guarde, con una importante sensibilidad a los agentes físicos, biológicos, químicos y ambientales. Las variaciones en el medio suponen que se desencadenen procesos irreversibles en la descomposición de los sustratos orgánicos, con lo que habrá que extremar el control de estos parámetros [4], [8]. Los valores para su conservación vienen recogidos en la tabla 1.

TABLA 1: Parámetros para una correcta conservación de las momias, fuente [6].

Temperatura	14-16°C
Humedad Relativa (HR)	25-40%
Concentración de O ₂	0-0.01%
Concentración de O ₃ , SO ₂ , NO ₂ , COV	0 µg/m ³
Iluminación lux	50 lm/m ²
Radiación UV	0-10 µW/lm
Máximo de iluminación anual	0.015 Mlx h/año

3.1. Humedad

La humedad está considerada el parámetro más importante a tener en cuenta para la conservación de estos restos, ya que influirá notablemente en su biodegradación además de suponer un riesgo mecánico/físico [9]. Así, todas las recomendaciones instan a mantener la HR por debajo del 50%, con lo que se controla la posible actividad biológica, aunque para evitar daños físico/mecánicos ésta se debe mantener por encima del 25%. Debemos tener en cuenta que las variaciones súbitas o fluctuaciones a corto plazo pueden suponer daños irreversibles más inmediatos, con lo que se recomienda una fluctuación de $\pm 5\%$ HR [6], [9].

3.2. Temperatura

En relación a la temperatura los valores no quedan tan férreamente establecidos, aunque diversos estudios conlucieran un rango entre 10-15°C como la variación ideal para reducir las reacciones bioquímicas [6], sin embargo las

tumbas en Egipto mantienen una temperatura anual entre 28-29°C. En este caso será fundamental la relación entre temperatura y HR, ya que un grado Celsius puede suponer una variación del 5% de HR, con lo que algunos investigadores limitan la fluctuación a $\pm 1^\circ\text{C}$ [9].

3.3. Iluminación

La foto-oxidación es otro daño que de manera acumulativa provoca un proceso de degradación por la acción combinada de luz y oxígeno, la luz debe ser absorbida por una sustancia química para que dé lugar a una reacción fotoquímica, degradación que desarrollara un conjunto de procesos que tendrá como consecuencia cambio químico [6], [9]. Estas reacciones se producen en la gama de radiaciones electromagnéticas desde el espectro visible hasta la radiación ionizante, por debajo de 400nm [6], [9]. Dado que las momias quedan encuadradas en la categoría de ser extremadamente sensibles a la luz [6], se recomienda exponerlas a longitudes de onda más largas, con un valor máximo de 50 lux y una dosis anual no mayor a 15.000 lux [6], [9]. Todo ello con filtros y fuente de iluminación más adecuada para cada caso.

3.4. Biodeterioro

El propio soporte de las momias facilita los nutrientes adecuados para la proliferación de agentes biológicos, favorecidos por unas determinadas condiciones de humedad y temperatura [7]. A su vez, la colonización de hongos atrae a los insectos, esta proliferación puede verse favorecida por tratamientos de conservación incorrectos. La actividad del agua en el propio sustrato (parámetro que representa la fracción molar de las moléculas totales de agua que se encuentran libres y no ligadas químicamente al sustrato) es una gran aliada de los microorganismos, siempre que los valores se encuentren dentro de los necesarios para su desarrollo, asociada a la HR. Además el pH del soporte (tabla 2) y la presencia o no de oxígeno determina el desarrollo celular de hongos y bacterias [7].

TABLA 2: Niveles de pH para bacterias y hongos [6].

	pH mínimo	pH óptimo	pH máximo
Bacterias	4.5	6.5-7.5	1.0
Hongos	1.5-3.5	4.0-6.5	8.0-11.5

3.5. Compuestos orgánicos volátiles (COV) y otros gases de polución

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) están causados por emisiones derivadas de las actividades antropogénicas cotidianas (como el Hexamethylcyclsiloxane asociado a productos de limpieza, siliconas o productos de perfumería) [6], [10] y otros contaminantes químicos presentes en los entornos urbanos industrializados como NO₂, SO₂, O₃, además, las propias momias pueden desarrollar emisiones a consecuencia de tratamientos de restauración (como biocidas o repelentes) [9]. Todo ello puede favorecer el desarrollo de hongos y bacterias en el interior del mobiliario de exposición. Es el caso de las bacterias nitrificantes, sulfo-oxidantes o sulfo-reductoras que se desarrollan en ambientes con monóxidos y dióxidos de azufre o nitrógeno [7]. Otras partículas especialmente

peligrosas son aquellas que son higroscópicas como el polvo que aumenta la actividad de agua y van asociadas a esporas de microorganismos e insectos [7]. Es por ello que resulta fundamental realizar tareas periódicas de análisis químico del aire interior de las vitrinas así como desarrollar elementos de monitoreo que permitan advertir la contaminación antes de que se desarrolle en la momia.

4. ACCIONES DE CONTROL

Podemos establecer la importancia del control medioambiental en una institución museística en dos niveles: macroclimático, relacionado con el entorno, el propio edificio y la sala donde se encuentre el bien, y microclimático, en relación con el mobiliario y el embalaje [1]. Si nos centramos a nivel microclimático, las vitrinas constituyen el recurso principal para establecer una correcta conservación de las momias compatible con su exposición al público. Pero para que esta premisa sea una constante es necesario llevar a cabo una serie de controles y acciones periódicas para que todos los factores vistos anteriormente no generen problemas que afecten a la obra a pesar de estar en una vitrina.

Los diferentes sistemas de exposición que encontramos en un museo dependerán de muchos factores, siendo el principal las características de obra que contiene, pudiendo ser herméticas o no, con sistemas de aire activos o pasivos o vitrinas libres de oxígeno [9].

En este sentido, el control de HR y temperatura es ampliamente conocido en el ámbito de los museos, se realiza periódicamente, con parámetros establecidos por la institución, con un registro informatizado, mediante sensores colocados en el interior de las bandejas de las vitrinas.

La iluminación debe utilizar la fuente que permita establecer los parámetros anteriormente establecidos, con la utilización de filtros de radiaciones si fuese necesario.

El control de biodeterioro se ha de llevar a cabo limitando las condiciones para que se desarrolle. Se presupone el control higrométrico con la monitorización y control climático en el museo pero además se debe realizar un control ambiental en el interior de la vitrina en relación con los COV y otros gases de polución. La actuación más eficaz es el filtrado del aire interior por diferentes medios en función del tipo de vitrina (filtros de carbono, sistemas de filtración portables o incorporados en las vitrinas) [10].

5. CONCLUSIONES

La exposición y conservación de los fondos en un museo requiere de una serie de condicionantes ambientales que tiene que aunar la propia conservación de los bienes de los que es custodio como mantener un medio ambiente que sea adecuado en su labor divulgativa, haciendo posible la visita y el trabajo dentro de la institución. El caso de las momias que hemos descrito es sólo uno de los múltiples objetos que nos encontramos en los museos, su conservación pasa innegablemente por la conservación preventiva como herramienta fundamental en este importante cometido.

Los diferentes estudios que se están llevando a cabo en

materia de control medioambiental y de calidad del aire de las vitrinas aunque incipientes creemos que podrían tener una gran proyección no sólo para las momias sino para el resto de bienes muebles de las diferentes colecciones, es por ello que desde aquí instamos a seguir investigando en este sentido.

Por último destacar que aunque nos hemos centrado en las momias que se encuentran en exposición este mismo esfuerzo debe ser llevado a cabo en aquellas que se encuentran en los almacenes, con controles periódicos y un correcto soporte que garantice su conservación.

REFERENCIAS

- [1] I. García Fernández, *La conservación preventiva de bienes culturales*, Alianza Editorial, Madrid, 2013.
- [2] M. García Heras y M.A. Villegas Broncano "Innovación y gestión de la conservación preventiva en museos" *Ph Investigación*, 5, diciembre de 2015, pp. 103-117.
- [3] J. A. Herráez (coord.) *Plan Nacional de Conservación Preventiva*, Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2015.
- [4] S. Díaz Martínez "Conservación in situ para restos bioarqueológicos, óseos y momificados. Preservar desde el principio" en *Momias: manual de buenas prácticas para su preservación*, N. Valentín y M. García (coor.), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2012, pp. 45-61.
- [5] M. García Morales "Objetos o sujetos. ¿Qué significado tienen las momias?" en *Momias: manual de buenas prácticas para su preservación*, N. Valentín y M. García (coor.), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2012, pp. 15-30.
- [6] M. Samadelli *et al.*, "Theoretical aspects of physical-chemical parameters for the correct conservation of mummies on display in museums and preserved in storage room" *Journal of Cultural Heritage*, 14, 2013, pp. 480-484.
- [7] N. Valentín, "Análisis y control del biodeterioro. A las plagas les gusta las momias", en *Momias: manual de buenas prácticas para su preservación*, N. Valentín y M. García (coor.), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2012, pp. 99-131.
- [8] N. Valentín, "Biosensores como sistema de alarma para detectar riesgos de biodeterioro en restos momificados. Estudios preliminares" en *Boletín del Museo Arqueológico Nacional*, 33, 2015, pp. 344-354.
- [9] S. Maekawa, "Las salas de exposición y almacenes para restos momificados. Vitrinas. Análisis de volátiles, ¿por qué huelen las momias?", en *Momias: manual de buenas prácticas para su preservación*, N. Valentín y M. García (coor.), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, 2012, pp. 133- 145.
- [10] B. Sánchez Cabrero *et al.*, "Calidad del aire interior de las vitrinas en el nuevo Museo Arqueológico Nacional" en *Boletín del Museo Arqueológico Nacional*, 33, 2015, pp. 367-381.



Irene Roncero Pérez es arqueóloga y graduada en Conservación y Restauración de Bienes Culturales en 2015 por la Universidad de Sevilla. Actualmente cursa el Máster de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide.

Colorimetría en el estudio del envejecimiento de polímeros y viabilidad de intervenciones de adhesión y consolidación en pintura actual

M^a Teresa Pastor Valls

Resumen—El presente artículo trata del uso y aplicación de la colorimetría como sistema de control para la evaluación del envejecimiento de polímeros y su viabilidad en las intervenciones de adhesión y consolidación, por lo que respecta a los cambios de tipo óptico.

Palabras Claves— Colorimetría, adhesivos, consolidantes, polímeros, envejecimiento, cambios, adhesión, consolidación.

1. INTRODUCCIÓN

A largo plazo, la eficacia de los tratamientos de estabilización (adhesión y consolidación) puede verse afectada por la acción directa de factores como la luz, la humedad relativa, la temperatura y los agentes ambientales. Estos aceleran las reacciones de deterioro de las obras, pero también de los materiales introducidos en su restauración[1].

Debido a las características de dichas intervenciones, los polímeros introducidos difícilmente podrán ser extraídos completamente tras una intervención, por lo que la reversibilidad será muy técnicamente muy limitada. Puesto que un cambio de color en la superficie tratada de una obra, y mucho más en arte contemporáneo, podría implicar además una alteración de su concepto, debemos asegurarnos de que la selección de los materiales y sistemas de aplicación cumpla ciertos requisitos de estabilidad, compatibilidad y buen envejecimiento.



Fig. 1. Evaluación de los cambios ópticos tras la consolidación de *El vendedor de cocos* de Salvador Soria, (Ateneo Mercantil de Valencia) en el IVC+R con un colorímetro X-Rite®. Foto: M. Pastor.

En este sentido, la espectroscopía UV-VIS y colorimetría nos aportarán información objetiva sobre los cambios

colorimétricos y de reflectividad de los productos antes y después de su introducción y envejecimiento. La aplicación de estas técnicas puede realizarse previamente tanto en probetas combinando el uso de cámaras de envejecimiento artificial o de brillómetros por lo que respecta a las características de superficie o emplearse como sistemas de control de la efectividad de los tratamientos en obra real. Así, se obtienen datos objetivos frente a la subjetividad de los estudios realizados visualmente.

2. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS Y COLORIMETRÍA:

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis es una técnica espectroscópica de absorción que implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible (visible y adyacentes: UV e IR cercanos). Esta mide la cantidad de energía que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación. Si una radiación monocromática atraviesa una disolución, se produce una relación entre la radiación incidente y la emergente denominada transmitancia (T). Así, el logaritmo de la inversa de la transmitancia es equivalente a la absorbancia (A), (1):

$$T = I/I_0 \text{ o } \%T = I/I_0 \cdot 100$$

Donde: I: radiación incidente, I₀: radiación emergente (1)

$$A = \log 1/T = \log I_0/I$$

En las sustancias sólidas la medida de la absorción de la radiación UV-VIS (190-900 nm) se realiza mediante el método de la Reflectancia difusa. Esta se mide a partir de la luz reflejada por la muestra, de forma que la reflectancia puede ser especular SP (en la misma dirección que la radiación luminosa incidente sobre la muestra) o difusa RD (de menor intensidad y a distintos ángulos que la radiación incidente sin dirección privilegiada, designando el reflejo de la luz para las superficies mates)[2].

En 1976, la CIE establece el sistema colorimétrico CIE L*a*b* (Fig. 281), siendo el más empleado por la industria, así como en el ámbito de la conservación restauración. Pues, desde hace décadas, la colorimetría constituye una

herramienta esencial en el control del deterioro de las obras y en la evaluación de los tratamientos de limpieza o las intervenciones de consolidación de estratos pictóricos pulverulentos.

3. INDICE DE AMARILLO Y DIFERENCIA TOTAL DE COLOR, ΔE^* :

Tras realizar las mediciones con un espectrofotómetro o colorímetro, pueden calcularse las variaciones de color, estableciéndose una tolerancia en las medidas de los parámetros cromáticos extraídos: L^* , a^* , b^* .

TABLA 1. $A^* B^* L^*$.

a^*	Tonalidad	Eje del color rojo (+) a verde (-)
b^*		Eje amarillo (+) a azul (-)
L^*	Luminosidad	Escala de 0 (negro) a 100 (blanco)

Para evaluar la diferencia entre dos colores, se emplea la ecuación de Diferencia total de color ΔE^* (2), siendo diferentes a partir de $\Delta E^* = +1,22$. También pueden calcularse las diferencias de luminosidad ΔL^* , saturación ΔC^*_{ab} y tono ΔH^*_{ab} , así como otro valor de gran interés para la conservación restauración, indicador de la oxidación, degradación o a la presencia de suciedad: el índice de amarilleo YI (3) [3].

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

Donde: ΔE^*

ΔL^* : $L^*_{\text{muestra}} - L^*_{\text{estándar}}$.

Δa^* : $a^*_{\text{muestra}} - a^*_{\text{estándar}}$.

Δb^* : $b^*_{\text{muestra}} - b^*_{\text{estándar}}$.

$$YI = 100 (1.28X - 1.06Z)/Y \quad (3)$$

$$YI = ((X-Z)/Y) .100$$

Donde X, Z e Y = valores triestímulos CIE

El valor medio de YI establecido como aceptable puede obtenerse por ejemplo a partir de cálculos de distribución de los valores obtenidos tras la medición de las muestras antes y después del envejecimiento.

Por otro lado, el valor de ΔE^* puede establecerse según los distintos criterios establecidos por la industria en el control de calidad de la producción de elementos iguales en serie (ej. $\Delta E^* < 3$, etc.) o escoger uno más bajo teniendo en cuenta la evolución futura de los materiales introducidos en un tratamiento de restauración y su posible afectación del color de los materiales constitutivos. En el ámbito de los bienes culturales el rango estaría entre 1 y 2, tal y como puede observarse en los distintos estudios sobre consolidación de los congresos del 2006 y 2008 organizados por el Cesmar7[4].

4. EVALUANDO EL ENVEJECIMIENTO DE FILMS POLÍMEROS Y LOS CAMBIOS TRAS LA ESTABILIZACIÓN DE PINTURA VINÍLICA:

La evaluación del envejecimiento de diversos polímeros orgánicos a nivel de color puede realizarse formando películas secas a partir de disoluciones concentradas en condiciones ambientales controladas. Una vez formados

los *films* estos pueden cortarse en función de las pruebas a desarrollar y del tipo de envejecimiento acelerado al que vayan a someterse para ser posteriormente comparados con un grupo patrón no envejecido.

Sin entrar en los resultados obtenidos para centrarnos en describir la metodología empleada en el desarrollo de diversas investigaciones llevadas a cabo en esta línea [5], señalar que para el estudio de los distintos tipos de polímero mediante reflectancia difusa, pueden prepararse tres unidades de 3,5 cm x 1,75 cm para cada clase de envejecimiento y grupo de referencia o patrón.

Además de las curvas de reflectancia, las coordenadas colorimétricas $L^* a^* b^*$ se extrajeron empleando un espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-670 de doble haz con un solo Monocromador y software Spectra Manager™ II, perteneciente a los laboratorios del Dpto. de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I, con las siguientes condiciones de trabajo: rango 200-2500 nm, velocidad de escaneo de 800 nm/min, intervalo de muestreo 1 nm, anchura del hendidado 2 nm y longitud de paso 10 mm¹.

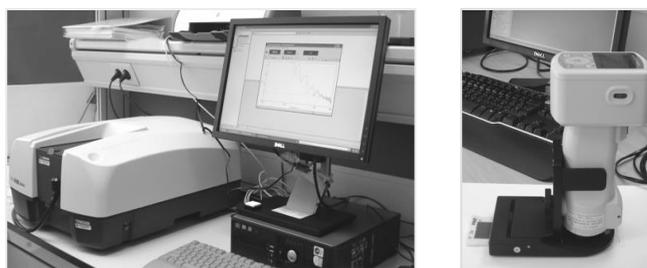


Fig. 2 y 3. Espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-670 (Dpto. Química inorgánica y orgánica, Universitat Jaume I) y Fig. 2. Espectrofotómetro/colorímetro Konica Minolta (IVC+R). Foto: M. Pastor.

Dado que las muestras eran transparentes, el calibrado fue realizado con un papel fotográfico ILROND® MATTE 190g/m², que era colocado a su vez como base de las muestras en cada lectura. Cada muestra fue analizada antes y después de ser sometida a envejecimiento acelerado.

Por lo que respecta a la evaluación de los cambios de color producidos en probetas realizadas con pintura pulverulenta vinílica tras la consolidación, se empleó espectrofotómetro Konica Minolta CM-700d y software Spectra Magic NX. Las medidas, llevadas a cabo en los laboratorios del IVC+R, antes y después de la intervención y posteriormente al envejecimiento seleccionado en cada caso. Las condiciones de trabajo fueron: rango espectral 400 nm-700 nm, intervalo de medida de 10 nm, iluminante D65, observador estándar de 10°, geometría óptica mediante sistema de esfera integradora de luz difusa d/8 (iluminación difusa, 8° ángulo detección), diámetro área de medida de 3 mm, componente especular excluido (SCE) y espacio de color CIE $L^*a^*b^*$.

A partir de dichas coordenadas, los cambios ópticos se determinaron a través del índice de amarilleo (YI) y dife-

rencia de color (ΔE), poniendo en relación ambos valores.

El gráfico siguiente corresponde a las coordenadas colorimétricas obtenidas antes del envejecimiento de 3 muestras de 16 polímeros orgánicos diferentes mostrando diversas tonalidades y niveles de transparencia de partida. A la hora de interpretar los resultados, teniendo en cuenta que las mediciones se realizaron aplicando una base blanca, se estableció que un valor de L^* de 100 correspondía a muestras transparentes.

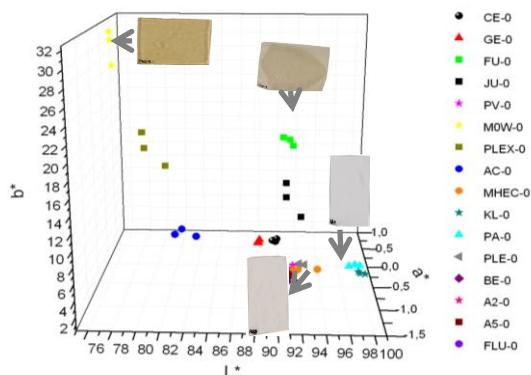


Fig. 4. Gráfico coordenadas L^* a^* b^* de 16 polímeros antes de envejecer. Gráfico: M. Pastor.

Además, se puso en relación el valor de YI y ΔE^* estableciendo una zona hipotética de seguridad en cuanto a la estabilidad a nivel de color de los materiales testados frente a los diversos tipos de envejecimiento seleccionados (A: termohigrométrico y B: termohigrométrico y fotooxidativo), los cuales representaban condiciones ambientales no controladas de interior según normativa (ver ilustración a continuación).

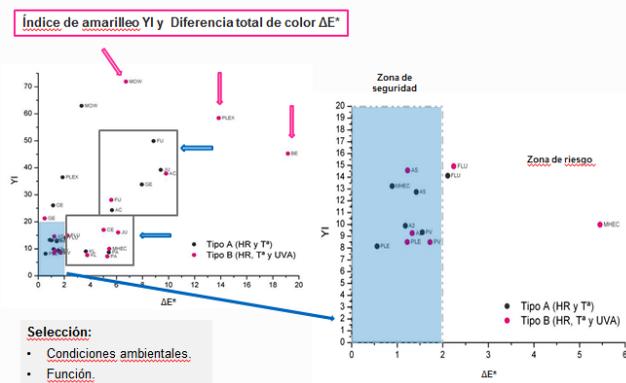


Fig. 5. Gráfico zona de seguridad a partir de la relación entre YI y ΔE^* 16 polímeros antes y después de envejecer. Gráfico: M. Pastor.

5. CONCLUSIONES

La aplicación de la colorimetría en la evaluación del comportamiento frente al envejecimiento de muchos materiales empleados en conservación restauración y en el estudio de la viabilidad y control de tratamientos técnicamente poco o nada reversibles como es el caso de las consolidaciones de estratos de color es sin duda alguna, de gran interés y utilidad práctica, aportando valores objetivos frente a la subjetividad de las evaluaciones a *visu*.

La información del color y brillo puede ser de gran ayuda en la selección del polímero en su aplicación como consolidante o medio de reintegración, principalmente.

REFERENCIAS

- [1] H. Velson, *Materials for conservation: organic consolidants, adhesives and coatings*, London: Butterworth, Heinemann, 1987, p. 39. VV.AA. *Science for Conservators. Adhesives and Coatings. Vol. 3*, New York: Museums & Galleries Commission and Routledge, 2005, p. 93.
- [2] La espectrofotometría mide la cantidad de energía que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación. B. Carlos, M. Ana, "Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano". [En línea]. ©Copyright 2009 Facultad Ingeniería. Universidad Buenos Aires, Argentina. <www.fi.uba.ar>. [Consulta: 24/04/17], p. 1. H. Manfred, M. Herbert, Z. B., *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*, Madrid: Síntesis, 1997, p. 7. LL. Mario, M. Guillermo, T., Ángele., E. Vicente, B. José, *La síntesis de pigmentos cerámicos con a práctica integral en el laboratorio de Química Inorgánica de l'estat sòlid*. Laboratori Avançat en Química IV. Química Inorgànica. Castellón: UJI, 2009, p. 111.
- [3] Diferencia total (ΔE^*ab): distancia geométrica entre las posiciones de dos colores en el espacio de color CIE 1976 $L^*a^*b^*$. Aumenta con el índice de amarilleo (YI) y disminuye con la luminosidad (L^*). ΔE^*ab de muestras próximas al blanco debe describirse con ΔE^*ab , ΔL^* y Δa^* y Δb^* , en lugar de ΔC^*ab y ΔH^*ab . AENOR. *Pinturas y Barnices. Colorimetría*. UNE 48-073-94/3. Madrid: AENOR, junio 1994, p. 3.
- [4] VV.AA. *L'Attenzione alle superfici pittoriche*. Atti CESMAR7 Milano, 2008. Padova: Il Prato, 2009, p. 181.
- [5] P. Teresa, J. David, "Consolidación y adhesión de pintura vinílica: estudio de la viabilidad y comportamiento frente al envejecimiento de diversos polímeros". *La Ciencia y el Arte VI. Ciencias y tecnologías aplicadas a la conservación de patrimonio*. Jornada 19 al 21 de octubre de 2016, Madrid (en imprenta). P. Teresa, "Gelatina tipo B y cola de esturión: comportamiento frente al envejecimiento acelerado en condiciones no controladas de interior". *Conversa, voces en la conservación*. Año 1 N° 4 - Septiembre 2015, [En línea]. <<http://conversaonline.wix.com/conversa#!gelatina-tipo-b/c1m37>>, Buenos Aires: Conversa, 2015. P. Teresa, "Estudio del comportamiento frente al envejecimiento acelerado de diversos polímeros". *16ª Jornada conservación arte contemporáneo*. Madrid: MNCARS-GEIIC, 2016, pp. 116-128.

M^a 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 Pictórico, 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.



Un vistazo a la ciencia forense. El denominado “efecto CSI”.

Sara Areales Barrero

Resumen—Las series y programas televisivos de investigación criminal provocan en sus espectadores la creencia de que la ciencia usada en los mismos es real, exagerando la capacidad de las técnicas actuales. Con el objetivo de contrarrestar esta creencia, explicaremos de forma breve algunas de las técnicas usadas actualmente en investigaciones criminales.

Palabras Claves— Cromatografía, “Efecto CSI”, Espectroscopía, Espectrometría de Masas, Inmunoensayos.



1. INTRODUCCIÓN

El “efecto CSI” tiene su origen en las series y programas de televisión policíacos surgidos a raíz del éxito de la serie CSI, cuyo nombre adopta este fenómeno, que inducen a sus espectadores a exagerar las capacidades de la ciencia forense.

De las consecuencias derivadas del mismo, tal vez la más preocupante sea la que se da en los juicios con jurado. Debido al elevado número de personas que ven estos programas, es de esperar que algunos de ellos compongan los jurados que han de juzgar ciertos delitos. Estudios revelan que, a partir de este fenómeno, ha sido cada vez más común que los jurados demanden pruebas irrazonables, especialmente una gran cantidad de evidencias físicas y pruebas de ADN, que no siempre son posibles. En algunas ocasiones, incluso se ha llegado a absolver al acusado debido a la falta de evidencias físicas, aun cuando el resto de pruebas apuntaran a su culpabilidad. Este fue, por ejemplo, el caso de Robert Blake en 2001 [1].

No obstante, la realidad de la ciencia forense dista un poco de lo que vemos en la televisión por lo que se muestran a continuación, de forma superficial, algunas técnicas actualmente utilizadas y su finalidad.

2. LA REALIDAD DE LOS ANÁLISIS

Aunque aún no se alcanza el nivel que aparece en las series de televisión, la ciencia forense sigue avanzando.

En la ficción, los analistas son capaces de extraer ADN de cualquier lugar (un cabello sin bulbo, una mancha minúscula, una fibra textil de la ropa del delincuente) algo que en la realidad no siempre es posible.

No obstante, las técnicas usadas han mejorado mucho. Cuando antes era necesaria una cantidad de al menos 20 nanogramos (ng) de ADN, actualmente, con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cantidad que necesitamos para nuestro análisis es mínima, de 5 ng para un análisis óptimo. La PCR es una técnica que amplifica el ADN de que disponemos un millón de veces, de forma similar a como se replica en nuestro organismo. También tiene la ventaja de que nos permite analizar muestras degradadas, algo que hasta hace poco no era posible [2].

Asimismo, se exagera el tiempo de los análisis, que se realizan en cuestión de minutos, además del uso de una sola técnica cuando en la realidad, para identificar los componentes de una muestra, son utilizadas normalmente dos. En primer lugar, una técnica presuntiva que nos va a permitir conocer si en esa muestra se encuentra lo que estamos buscando o de qué se trata (por ejemplo, si es saliva o sangre). En segundo lugar, debido a los falsos positivos que podemos obtener con la primera, usaremos una técnica de confirmación para constatar el resultado anterior [3].

3. TÉCNICAS USADAS EN LAS CIENCIAS FORENSES

A continuación se exponen algunas de las técnicas actuales y su uso forense.

3.1. Inmunoensayos

Son utilizados en la detección de drogas y venenos en fluidos corporales y reproducen la reacción que ocurre en nuestro propio organismo cuando, por ejemplo, nos ponemos enfermos. En los inmunoensayos, el anticuerpo se encuentra adherido a una superficie sólida, al fondo de un recipiente de cristal o plástico. Se añade al recipiente la droga unida a un compuesto denominado “etiqueta” que es algo que podemos detectar como, por ejemplo, un compuesto que emita fluorescencia. El complejo droga-etiqueta queda unido al anticuerpo. De este modo, al añadir una muestra con una elevada concentración de droga, la misma desplazará al compuesto droga-etiqueta para adherirse al anticuerpo en su lugar. Para conocer la cantidad de droga que contenía la muestra basta con cuantificar la droga inicial (unida al compuesto etiqueta) que ha sido desplazada [4].

El valor límite para un análisis óptimo de opiáceos y cocaína en muestras de pelo es de 500 ng/g, y en orina de 300 ng/ml. No obstante, esta técnica es presuntiva y precisa de una técnica de confirmación. La que se usa normalmente es la cromatografía de gases [5].

3.2. Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA)

Esta técnica se basa en que cada átomo particular tiene niveles de energía únicos para sus electrones, los cuales están cuantizados. Para usar esta técnica necesitamos que los elementos se encuentren en su estado atómico, por lo que usamos una llama para romper mediante calor los enlaces moleculares. Con una lámpara de cátodo hueco del elemento a determinar (por ejemplo: cobre, hierro,...) emitimos luz traspasando la llama en la que los átomos de ese mismo elemento la absorberán, disminuyendo así de intensidad al llegar al detector. Antes de llegar al detector, la luz pasa por un monocromador, que aísla la longitud de onda que ha sido seleccionada para el análisis. Según la cantidad de luz que la muestra absorba podremos deducir la concentración de átomos del elemento a determinar que hay en la misma usando una curva de calibrado hecha con concentraciones conocidas [6].

En la Figura 1 se muestra un esquema de esta técnica.

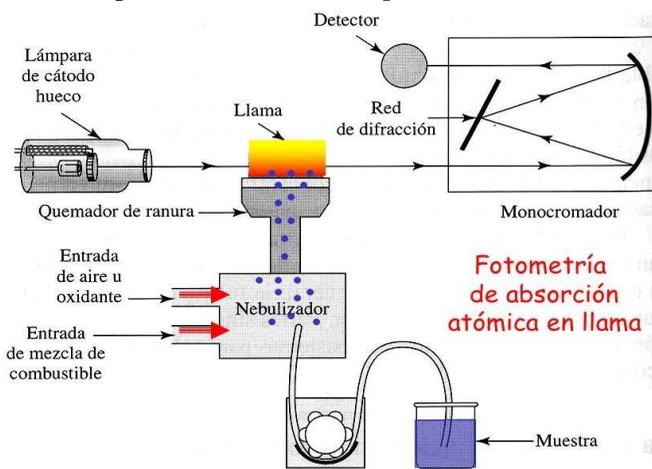


Fig. 1. Espectrometría de Absorción Atómica.

Usamos la EAA para la detección de los metales que quedan como residuo tras un disparo como nitritos y nitratos procedentes de la pólvora; cobre y plomo del detonador y bario y antimonio de la carga iniciadora [6].

3.3. Espectroscopía infrarroja

La luz, al pasar por un material específico, es absorbida a una cierta longitud de onda característica del mismo. Se puede, de este modo, identificar un determinado compuesto según emita o absorba una cierta longitud de onda, y también cuantificarlo ya que la cantidad de luz absorbida o emitida dependerá de la concentración del mismo. El espectro electromagnético de una sustancia es, por tanto, propio de la misma, y dos sustancias diferentes nunca tendrán el mismo [7].

Esta técnica se basa asimismo en la teoría vibracional, según la cual una molécula está constantemente vibrando, teniendo los enlaces de una sustancia frecuencias de vibración específicas correspondientes a los niveles de energía moleculares. No todos los modos de vibración

aparecerán representados en el espectro de esa sustancia como picos de absorción, tan solo aquellos que originen un cambio en el momento dipolar de la molécula. Estos modos de vibración característicos nos permiten conocer la geometría molecular e, incluso cuando se trata de moléculas muy complejas, podemos reconocer ciertos modos de vibración como pertenecientes a determinados grupos moleculares [7], [8].

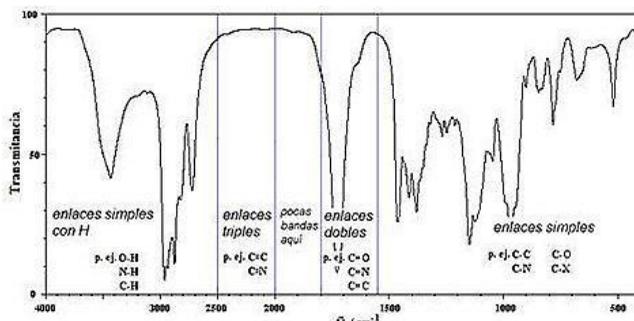


Fig. 2. Espectro infrarrojo

En la Figura 2 se muestra un espectro infrarrojo y los diferentes enlaces que se deducen de él, los cuales nos dan una idea bastante precisa de la estructura del compuesto analizado.

Esta técnica es usada en el análisis de sustancias que puedan producir una intoxicación, o una contaminación del medio ambiente que resulte perjudicial para la población (drogas, medicamentos, venenos, etc) [7].

3.4. Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía es un método de separación constituido por dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil, y es la diferente afinidad de los componentes de una mezcla por cada fase lo que determinará su velocidad a lo largo del sistema, provocando la separación de los componentes. En la Cromatografía de Gases la fase móvil es un gas [4]. En la Figura 3 se muestra un Cromatógrafo de Gases.

La muestra se inyecta en la fase móvil, que es un gas inerte que no interactúa con la misma (normalmente Helio), y los distintos componentes pasan a través de la fase estacionaria, constituida por una columna capilar dentro de un horno con incremento de temperatura programado. Los componentes más fuertemente retenidos por la fase estacionaria se moverán más lentamente a lo largo de la fase móvil y viceversa. Consecuentemente, los componentes se separarán en bandas según hayan

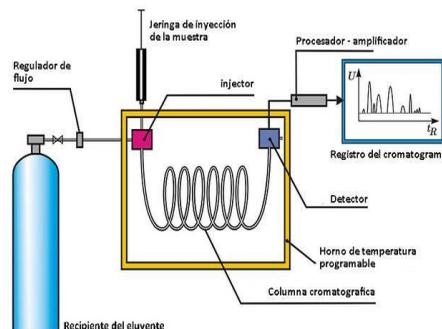


Fig. 3. Cromatógrafo de Gases

salido antes o después, las cuales podrán analizarse [9].

Podemos acoplar al cromatógrafo de gases un espectrómetro de masas. La espectrometría de masas es una técnica muy sensible y rápida que proporciona un espectro característico de la molécula, lo que permite la identificación del compuesto y, además, permite medir la concentración del mismo. En el espectrómetro de masas se ioniza la muestra mediante impacto electrónico. Además de la molécula ionizada también se forman fragmentos por descomposición de los iones moleculares, cuya proporción es característica de cada molécula. Una vez ionizadas se les imprime a las moléculas energía cinética; la velocidad de cada ión dependerá de su masa y todo ello conformará el espectro de masas de la sustancia que es propio de cada compuesto y permite una identificación muy precisa del mismo [9].

En síntesis, el cromatógrafo de gases separa muestras complejas y el espectrómetro de masas las analiza y, de forma casi inequívoca, identifica los compuestos.

Su uso es muy extenso, pasando por el análisis de metabolitos de drogas en fluidos biológicos, residuos de explosión, residuos de incendios, muestras ambientales, etc [10].

4. CONCLUSIONES

Apenas hemos echado un vistazo a las técnicas que normalmente se emplean. Hay muchas más de las mencionadas, y los usos de las mismas van más allá de los citados, que no eran sino un ejemplo de su utilización. La intención de presentar estas técnicas no es más que tener una idea genérica de cuáles son esos procesos que los laboratorios criminalísticos de las series de televisión nos muestran.

Hay que tener en cuenta que la ciencia forense va mejorando día a día. Tal vez no sea posible la realización de todo lo que sale en la televisión, pero cada vez hacemos posible más cosas. El tiempo que tardan en hacerse los análisis ha mejorado (algunos no precisan más que unos pocos segundos) así como la sensibilidad de las técnicas. En los comienzos de la Biología Forense todo lo que podíamos determinar a partir de una mancha de sangre era a qué grupo sanguíneo pertenecía, y ahora podemos extraer el perfil genético de un individuo.

Es importante no mezclar lo que es real con lo que se exagera para obtener audiencia, pero tampoco debemos olvidar que la ciencia forense va avanzando inexorablemente haciendo de la ficción, poco a poco, una realidad.

REFERENCIAS

- [1] Houck, Max M. "Realidad y Ficción de la Ciencia Forense". Investigación y Ciencia. Septiembre de 2006, nº 360, p69-73.
- [2] Web de la Universidad de Granada. <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>
- [3] García Rodríguez, S. Giménez, M. "Recursos Humanos e Instrumentales en un laboratorio Toxicológico Forense". Revista de Toxicología.

2005, vol 22, nº 2, p.76-77.

- [4] Bell, Suzanne. "Essentials of Forensic Science. Drugs, Poison and Chemistry". Ed. Facts On File, Inc. 2009.
- [5] Hernández, Antonio F. Gil, Fernando. Pla, Antonio. "Nuevas Perspectivas en el Análisis de Drogas de Abuso para el año 2000". Revista Electrónica de Ciencia Penal y Criminología. 1999, nº1.
- [6] Soria Hernando, Soraya. "Determinación de metales en residuos de disparo por Espectroscopía de Absorción Atómica". Trabajo de Fin de Grado, Departamento de Química. Universidad de Burgos. Febrero de 2012.
- [7] García Bernal, José A. "Aplicaciones de la Espectroscopía Infrarroja en el área Clínica Forense y Toxicológica". Trabajo de Fin de Grado, Facultad de Bioanálisis. Universidad Veracruzana. Febrero de 2007.
- [8] Ebla Becerra, Winston J. Narvaez Pilco, Jorge G. "Determinación de cocaína en muestras inorgánicas procedentes del distrito de Chimborazo por el método de Espectroscopía Infrarroja y Cromatografía de Gase que ingresan al laboratorio de química forense del departamento de Criminalística de la Policía Judicial de Chimborazo en el período diciembre 2013- mayo 2014". Trabajo de Fin de Grado, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Chimborazo. Diciembre de 2014.
- [9] Gutiérrez, María.C. Droguet, Marta. "La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: identificación de compuestos causantes del mal olor". Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial. 2012, nº122.
- [10] Stashenko, Elena E. René Martínez, Jairo. "Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas". Scientia Chromatographica. 2010, vol. 2, nº1.



Sara Areales Barrero estudiante de cuarto año de Criminología en la Universidad Pablo de Olavide.

Aplicaciones de CRISPR en la generación y síntesis de nuevos fármacos

Álvaro Quílez Borrachero

Resumen—CRISPR-Cas es una herramienta de edición genómica fundamentada en un mecanismo de defensa de bacterias frente a material genético exógeno. Esta herramienta, cuyos pilares son la enzima Cas9 u otras relacionadas y una cadena de ARN guía, permite la obtención en semanas o meses de resultados que con las herramientas de edición genética tradicionales podían tomar años. A esto hay que sumar que ofrece la posibilidad de realizar edición génica en contextos en los que antes era inviable. Es por ello que su uso ha favorecido el desarrollo de modelos de enfermedades, tanto en células como en animales, de gran utilidad en ensayos preclínicos, así como la identificación y validación de dianas de fármacos. Además, resulta de utilidad en la síntesis de proteínas recombinantes con acción terapéutica. No obstante, presenta algunas limitaciones, por lo que en ciertos casos no ha desplazado a otros métodos ya asentados.

Palabras Claves—CRISPR-Cas, Screening, Modelos celulares, Modelos animales, Factorías celulares, SWITCH.

1. INTRODUCCIÓN

CRISPR-Cas es una herramienta de edición genómica basada en un sistema de defensa de procariontes. Uno de los eventos clave en su desarrollo fue el descubrimiento de secuencias palindrómicas de 30 pares de bases, repetidas y separadas por espaciadores de 36 pares de bases en la arquea *Haloferax mediterranei* por el investigador Francisco J. M. Mojica en 1993. Años después, estas secuencias palindrómicas, repetidas en el genoma de bacterias, arqueas y mitocondrias, fueron nombradas como CRISPR (del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Además, se observó que las secuencias espaciadoras provenían de material genético no perteneciente al organismo, sino de fuentes externas, como virus bacteriófagos. Estas secuencias forman parte del transcrito que guía a nucleasas asociadas a CRISPR como Cas9, permitiéndoles identificar y cortar el ADN de organismos invasores. A raíz de CRISPR y Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna presentaron en 2012 el sistema CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genómica. Paralelamente, el equipo de Feng Zhang había estado trabajando en el uso de este sistema en células eucariotas, y fue en Enero de 2013 cuando se publicó su uso en la edición genómica de células de mamífero [1].

Desde entonces, la tecnología basada en CRISPR-Cas ha seguido en constante desarrollo y optimización. Su ortogonalidad, eficacia y rapidez, sumadas a su bajo coste en comparación con otras técnicas, ha supuesto una revolución en la edición genómica. La técnica se basa en el corte de la doble hebra de ADN diana por la endonucleasa Cas9 (u otra enzima) de forma específica. Esa especificidad la marca un ARN guía (sgRNA) diseñado en función de la secuencia diana. El corte es reparado por los mecanismos de reparación de la célula. Esta reparación puede darse por distintas vías (reflejadas en la figura 1): la unión

de extremos sin homología (estrategia seguida, por ejemplo, cuando se busca interrumpir un gen) o la reparación dirigida por homología (de gran utilidad a la hora de insertar secuencias en un locus específico) [2], [3].

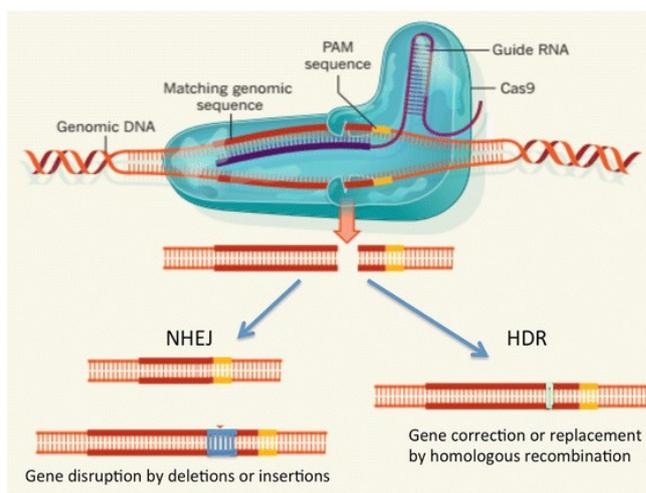


Fig. 1. Elementos del sistema CRISPR-Cas9 [4]. Siglas: NHEJ, unión de extremos sin homología. HDR, reparación dirigida por homología. PAM, Motivo Adyacente de Protoespaciador.

Además, existen variantes de Cas9 cuyo uso permite regular la expresión de un gen, bien sea inhibiéndola (CRISPRi) o aumentándola (CRISPRa), como puede observarse en la tabla 1 [3].

La versatilidad de esta tecnología hace que haya sido adoptada en diversidad de aplicaciones biotecnológicas, entre las que se encuentra la generación de fármacos. En esta revisión veremos ejemplos de su aplicación en la generación de plataformas de cribado de fármacos, la identificación de genes esenciales en patógenos que puedan servir como diana de antibióticos, y la generación y optimización de factorías celulares, útiles en la síntesis de algunos fármacos.

TABLA 1
COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS DERIVADAS DE CRISPR

Característica	CRISPRn	CRISPRi	CRISPRa
Efecto	Knockout	Knockdown	Activación
Mecanismo	Delección o inserción causante de mutación	Interferencia transcripcional	Activación transcripcional
Diana	Cualquier región del genoma con PAM	Sitios de iniciación de la transcripción con PAM	Sitios de iniciación de la transcripción con PAM

Siglas: CRISPRn, CRISPR nucleasa. CRISPRi, CRISPR inhibidor. CRISPRa, CRISPR activador. PAM, Motivo Adyacente de Protoespaciador.
Tabla Modificada De La Referencia [3].

2. GENERACIÓN DE MODELOS CELULARES

Los cultivos de células humanas pueden dar lugar a modelos de enfermedades que sirvan como plataformas para realizar cribados de fármacos. La obtención de células pluripotentes a partir de células somáticas humanas adultas y su posterior diferenciación, publicada por primera vez por el equipo de Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka en 2007 ha sido uno de los grandes pasos en la generación de este tipo de modelos, ya que no presenta las limitaciones técnicas y la controversia ética del uso de células madres embrionarias. Otro de los avances importantes ha sido el desarrollo de CRISPR-Cas, que ofrece la posibilidad de generar modelos celulares de enfermedades a partir de células madre de una forma más sencilla que con otro tipo de métodos como las nucleasas con dedos de zinc o la recombinación homóloga [5].

Un ejemplo del empleo de modelos celulares generados con CRISPR para el cribado de fármacos ha sido la generación de una línea celular modelo de la enfermedad de Fabry, cuya causa es un defecto en el gen de la α -galactosidasa A (*GLA*). Para ello, se generaron knockouts para el gen *GLA* a partir de células HEK-293-T, lo que permitió el estudio de la farmacocinética de la α -galactosidasa A humana recombinante (*rha*-*GLA*) in vitro. También permitió la observación de que la coadministración de MG132, un inhibidor del proteasoma, junto con *rha*-*GLA* podía mejorar la eficacia del tratamiento [6].

Sin embargo, existen ciertos casos en los que el uso de CRISPR presenta limitaciones. Si bien la generación de knockouts se puede realizar en prácticamente cualquier célula, la generación de mutantes mediante reparación directa por homología es limitada en células humanas no mitóticas como las neuronas. Otra de las limitaciones aparece cuando se intentan generar interrupciones en genes que se encuentran en un gran número de copias, ya que la gran cantidad de roturas generadas puede dar lugar a una parada del ciclo celular [3].

3. GENERACIÓN DE MODELOS ANIMALES

Con CRISPR, es posible alterar varios genes en un solo paso, por lo que ratones mutantes en varios genes pueden ser rápidamente generados evitándose la necesidad

de la realización de cruzamientos. Por otro lado, al existir la posibilidad de editar directamente el cigoto, no es necesario la derivación y el cultivo de células madre embrionarias, el cual, hasta ahora, ha sido uno de los pasos limitantes en la generación de mutantes en ciertas especies. También evita la necesidad de realizar retrocruzamientos para añadir mutaciones adicionales a modelos de enfermedad preexistentes. La generación de modelos aplicando CRISPR puede ser llevada a cabo en meses o semanas, mientras que por otros métodos puede llevar años [3].

Además, es posible generar mutaciones somáticas en algunos tejidos de animales adultos mediante el uso de CRISPR-Cas. Por ejemplo, en un experimento se inyectó un plásmido con las secuencias de Cas9 y del sgRNA de los genes supresores de tumores *Pten* y *p53* para generar modelos de cáncer de hígado, obteniéndose un fenotipo similar al obtenido delecionando estos genes mediante la técnica Cre-LoxP [7].

4. IDENTIFICACIÓN DE DIANAS EN ORGANISMOS PATÓGENOS

El desarrollo de resistencia a antibióticos es un problema de gran importancia hoy día. Es por ello, que el descubrimiento de nuevos genes esenciales en organismos patógenos mediante estudios genómicos es de gran ayuda a la hora de encontrar dianas que puedan servir para el desarrollo de nuevos antibióticos. *Streptococcus pneumoniae* es una causa de mortalidad importante a nivel mundial, y los principales antibióticos utilizados contra esta son de la clase betalactámicos, que actúan sobre las proteínas de anclaje de penicilinas, esenciales para la síntesis de peptidoglicano y el mantenimiento de la integridad celular. Sin embargo, la resistencia a este tipo de antibióticos es muy frecuente [8].

Mediante el uso de CRISPRi, ha sido posible encontrar nuevos genes esenciales para la síntesis de peptidoglicano (MurT y GatD), así como genes responsables de la polimerización del ácido teicoico (TarP y TarQ), un ácido que se encuentra anclado a la membrana celular o unido covalentemente a peptidoglicano y es esencial para el mantenimiento de la forma de la célula. Muchos de los genes identificados como esenciales en los estudios genómicos presentan una función desconocida o hipotética, y se piensa que parte de estos genes están implicados en la síntesis de la pared celular.

En un estudio, se generó una genoteca con 348 genes previamente identificados como esenciales, se reprimió su función con CRISPRi y se observaron alteraciones en el crecimiento. Se utilizó la variante catalíticamente inactiva dCas9, que al unirse al extremo 5' del gen diana bloquea la transcripción. Para ello, se integraron en *S. pneumoniae* cepa D39 las secuencias que codificaban para el sgRNA de las dianas bajo el promotor constitutivo P3, y la secuencia de dCas9 bajo el promotor inducible *P_{lac}*. Se observaron alteraciones en el crecimiento y/o una mayor tasa de lisis tras la represión génica inducida en 254 de los casos. Al observar la morfología celular causada por la represión de algunos de los genes estudiados, se observaron similitudes con la morfología causada al reprimir

genes esenciales de función conocida por el mismo método. Con estos datos, junto a un análisis bioinformático, se pudieron identificar genes implicados en la síntesis de peptidoglicano y en la polimerización de ácido teicoico, además de validar la función de genes en los que previamente estaba catalogada como hipotética [8].

Estudios de fenotipado de alto rendimiento basados en CRISPRi han sido también realizados en *Bacillus subtilis* [9]. También se han identificado genes esenciales para parásitos apicomplejos con estudios realizados aplicando CRISPR-Cas9 en *Toxoplasma gondii* [10]. Se puede concluir que se trata de una valiosa herramienta para identificar la función de genes esenciales y por lo tanto de posibles dianas para antibióticos.

5. GENERACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE FACTORÍAS CELULARES

La fermentación llevada a cabo por levaduras o bacterias es una fuente de metabolitos, enzimas y diversas proteínas terapéuticas. Sin embargo, aunque su existencia no es algo nuevo, el desarrollo y la optimización de cepas es un proceso laborioso y que requiere mucho tiempo. Es por ello que el desarrollo de métodos que aceleren este proceso es de gran interés para industrias como la biotecnológica o la farmacéutica.

Tecnologías basadas en CRISPR-Cas pueden lograr este desarrollo de forma más rápida que los métodos tradicionales. Esto se debe a que la enzima Cas9 es capaz de modificar o introducir múltiples genes en un solo experimento de forma muy eficiente, y a las opciones de regulación que permiten variantes como dCas9 [11], [12].

Investigadores de la Technical University of Denmark han desarrollado el sistema SWITCH. Este método está basado en Cas9/dCas9, y con él se han generado factorías de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de producir naringerina, un flavonoide con capacidad antioxidante, antiinflamatoria, hipocolesterolemiante [13] y antiviral [14], [15]. Además, la técnica ha permitido optimizar el proceso reduciendo la expresión del gen esencial TSC13, responsable de la formación de un subproducto cuya vía biosintética compite con la de la naringerina. SWITCH se basa en ciclos de cuatro pasos que implican: (1) la integración de genes *cas* en loci específicos, (2) la ingeniería genética catalizada por Cas, (3) el reemplazo de *cas* por *dcas* y (4) alteración de la expresión mediada por dCas [11]. Este prometedor método podría aplicarse a cepas de levadura ya utilizadas para producción de compuestos, así como a otras especies.

6. CONCLUSIONES

La tecnología basada en CRISPR puede suponer una revolución para la edición genética. Entre sus muchas aplicaciones, cabe destacar su papel en la investigación farmacéutica y el desarrollo de fármacos. Esto se debe a que puede acelerar el descubrimiento, la validación y el testeo de nuevos fármacos al optimizar la generación de nuevos modelos animales y celulares, así como la identificación de nuevas posibles dianas en organismos patógenos co-

mo *S. pneumoniae* o *T. gondii*. Además, resulta de gran utilidad en la síntesis de compuestos terapéuticos al permitir la generación y optimización de factorías celulares con sistemas como SWITCH.

Sin embargo, esta tecnología no está exenta de limitaciones y para determinadas aplicaciones aún no ha desplazado a otras técnicas, por lo que aún existe margen de mejora para su optimización.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. S. Lander, "The Heroes of CRISPR," *Cell*, vol. 164, no. 1–2, pp. 18–28, 2016, doi:10.1016/j.cell.2015.12.041.
- [2] S. Shen, T. J. Loh, H. Shen, X. Zheng, and H. Shen, "CRISPR as a Strong Gene Editing Tool," *BMB Rep.*, vol. 50, no. 1, pp. 20–24, 2017, doi:10.5483/BMBRep.2017.50.1.128.
- [3] C. Fellmann, B. G. Gowen, P.-C. Lin, J. A. Doudna, and J. E. Corn, "Cornerstones of CRISPR–Cas in Drug Discovery and Therapy," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 2, pp. 89–100, 2016, doi:10.1038/nrd.2016.238.
- [4] Z. Tu, W. Yang, S. Yan, X. Guo, and X.-J. Li, "CRISPR/Cas9: a Powerful Genetic Engineering Tool for Establishing Large Animal Models of Neurodegenerative Diseases," *Mol. Neurodegener.*, vol. 10, no. 1, p. 35, Dec. 2015, doi:10.1186/s13024-015-0031-x.
- [5] J. L. Freiermuth, I. J. Powell-Castilla, and G. I. Gallicano, "Towards a CRISPR picture: Use of CRISPR/Cas9 to Model Diseases in Human Stem Cells in Vitro," *J. Cell. Biochem.*, no. May 2017, 2017, doi:10.1002/jcb.26162.
- [6] H.-Y. Song et al., "Using CRISPR/Cas9-Mediated GLA Gene Knockout as an In Vitro Drug Screening Model for Fabry Disease," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 12, Dec. 2016, doi:10.3390/ijms17122089.
- [7] W. Xue et al., "CRISPR-mediated Direct Mutation of Cancer Genes in the Mouse Liver," *Nature*, vol. 514, no. 7522, pp. 380–4, Oct. 2014, doi:10.1038/nature13589.
- [8] X. Liu et al., "High-throughput CRISPRi Phenotyping in Streptococcus Pneumoniae Identifies New Essential Genes Involved in Cell Wall Synthesis and Competence Development," *Mol. Syst. Biol.*, pp. 1–18, 2017, doi:10.15252/msb.20167449.
- [9] J. M. Peters et al., "A Comprehensive, CRISPR-based Functional Analysis of Essential Genes in Bacteria," *Cell*, vol. 165, no. 6, pp. 1493–1506, Jun. 2016, doi:10.1016/j.cell.2016.05.003.
- [10] S. M. Sidik et al., "A Genome-wide CRISPR Screen in Toxoplasma Identifies Essential Apicomplexan Genes," *Cell*, vol. 166, no. 6, pp. 1423–1435.e12, 2016, doi:10.1016/j.cell.2016.08.019.
- [11] K. G. Vanegas, B. J. Lehka, and U. H. Mortensen, "SWITCH: a dynamic CRISPR tool for genome engineering and metabolic pathway control for cell factory construction in *Saccharomyces cerevisiae*," *Microb. Cell Fact.*, vol. 16, no. 1, p. 25, 2017, doi:10.1186/s12934-017-0632-x.
- [12] A. A. Dominguez, W. A. Lim, and L. S. Qi, "Beyond Editing: Repurposing CRISPR–Cas9 for Precision Genome Regulation and Interrogation," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 5–15, Dec. 2015, doi:10.1038/nrm.2015.2.
- [13] O. Benavente-García and J. Castillo, "Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 15, pp. 6185–6205, Aug. 2008, doi:10.1021/jf8006568.
- [14] J. Goldwasser et al., "Naringenin Inhibits the Assembly and

Long-term Production of Infectious Hepatitis C Virus Particles through a PPAR-mediated Mechanism," *J. Hepatol.*, vol. 55, no. 5, pp. 963–971, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.jhep.2011.02.011.

- [15] S. Frabasile et al., "The Citrus Flavanone Naringenin Impairs Dengue Virus Replication in Human Cells," *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 41864, Feb. 2017, doi:10.1038/srep41864.



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.

Nuevos fármacos para el tratamiento de la tuberculosis

Ana Guzmán Serrano

Resumen—Aunque la tuberculosis se considera una enfermedad controlada y con un tratamiento efectivo, en los últimos años han vuelto a surgir casos de esta enfermedad por todo el mundo. Esto se debe en gran parte a la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes al tratamiento utilizado convencionalmente. Esta resistencia al tratamiento y la alta morbimortalidad a nivel mundial ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos fármacos para poder combatir esta enfermedad. Para ello, se han llevado a cabo dos estrategias diferentes: utilizar fármacos ya existentes para el tratamiento de otras infecciones y darles un nuevo enfoque como posible tratamiento para la tuberculosis, y desarrollar nuevas entidades químicas que actúen sobre distintas dianas de *M.tuberculosis*. De esta manera, en los últimos 10 años han surgido numerosos compuestos, muchos de los cuales se encuentran en ensayos clínicos, que presentan propiedades muy prometedoras para el tratamiento de esta enfermedad. En este artículo se incluyen los tratamientos empleados convencionalmente para combatir la tuberculosis así como nuevos fármacos y estrategias que se encuentran actualmente en desarrollo.

Palabras Claves— Desarrollo de fármacos, Micobacteria, Multirresistencia, Nuevos tratamientos, Tuberculosis



1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad multifactorial y es considerada como un problema de salud mundial debido a su alta prevalencia e índices de morbimortalidad. En los años 60, la TB se creía controlada, sin embargo, desde entonces, se ha observado una reemergencia de la enfermedad debido a diversos factores como la aparición y expansión de cepas multidrogo-resistentes (MDR) y del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros [1].

De acuerdo con la OMS, en 2014, 9.6 millones de personas desarrollaron TB, de los cuales 1.5 millones murieron. La incidencia de esta enfermedad está distribuida heterogéneamente a lo largo del mundo, siendo África el país con mayor incidencia de la enfermedad, debido principalmente a la epidemia de HIV en esta región. India, China, el sur de África y Rusia presentan casi el 60% de todos los casos de TB a nivel mundial, mientras que en los Estados Unidos y Europa la mayoría de los casos de TB ocurren en residentes de países en los que esta enfermedad es endémica [1,2].

Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene TB latente, término aplicado a las personas infectadas pero que aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. Estas personas infectadas tienen un riesgo a lo largo de la vida de enfermarse de TB de un 10%, sin embargo, los individuos inmunodeprimidos corren un riesgo mucho mayor [1].

Entre los factores de riesgo de la TB, el más reconocido es la infección por el virus del VIH. Las personas infectadas por el VIH tienen entre 20 y 30 veces más probabilidades de desarrollar TB activa, riesgo que también es más elevado en las personas que padecen otros trastornos del sistema inmunitario. Sin embargo, ya que los individuos VIH positivos constituyen solo el 0.5% de la población

mundial, debe haber otros factores de riesgo para esta enfermedad. Por ejemplo, un 27% de los casos de TB se atribuyen a la desnutrición y un 22% a la contaminación del aire. Otros factores de riesgo incluyen la diabetes mellitus tipo 2, el abuso del alcohol (ambos triplican el riesgo) y el hábito de fumar, que duplica el riesgo [1].

Debido a la aparición de cepas resistentes, el desarrollo de nuevos fármacos para tratar la TB se ha convertido en un gran reto para los investigadores de todo el mundo. En los últimos 10 años, se han realizado muchos esfuerzos por entidades como la OMS, FDA y distintas organizaciones para desarrollar nuevos fármacos y tratamientos para combatir esta enfermedad. Muchos de los fármacos desarrollados aún se encuentran en fases preclínicas o no han llegado a comercializarse todavía, pero las pruebas que se están llevando a cabo con ellos muestran resultados muy prometedores en cuanto a la eliminación de *M.tuberculosis* y la erradicación de la enfermedad.

2. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La TB es una infección bacteriana que afecta principalmente a los pulmones y el sistema respiratorio. El agente causante de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*, conocido también como bacilo de Koch en honor a Robert Koch, que lo descubrió en 1882 [1,2].

El contagio se produce habitualmente por vía aérea. Al toser se generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas (gotas de Flügge), en cuyo interior se encierran uno o dos bacilos. Las partículas de tamaño superior a 10 μm quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y 5 μm) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenan la infección primaria. En la mayoría de las ocasiones, los escasos bacilos que llegan hasta los alvéolos son fagocitados y destruidos por los macrófagos. Sólo un

pequeño porcentaje de las personas infectadas (aproximadamente, el 10%) llegará a desarrollar la enfermedad; la mitad de ellos tempranamente, a los pocos meses de la infección, mientras que el otro 5% necesitará de un largo intervalo (a veces, de varias décadas) para que se produzca la reactivación endógena de lesiones aparentemente curadas que albergan en su interior micobacterias en condiciones metabólicas adversas pero potencialmente viables [1,2].

Como ya se ha mencionado, tras la inhalación de *M. tuberculosis*, es translocada al tracto respiratorio inferior, donde se encuentra con los macrófagos alveolares, el tipo celular que este microorganismo infecta predominantemente. Estas células internalizan la bacteria por fagocitosis mediada por receptor y una vez que ha sido internalizado, *M. tuberculosis* bloquea la fusión del fagosoma con el lisosoma, asegurando así su supervivencia. Luego, a través de la actividad del sistema de secreción ESX-1, *M. tuberculosis* puede desestabilizar la membrana del fagosoma, causando la liberación de productos bacterianos incluyendo el ADN de la micobacteria, dentro del citosol del macrófago. Esta liberación de productos bacterianos al citosol del macrófago puede activar vías de supervivencia que resulten en el crecimiento de *M. tuberculosis* [1,3].

Tras infectar los macrófagos alveolares, este microorganismo llega al intersticio pulmonar donde evoluciona el proceso de infección. A continuación, se recluta a numerosas células al sitio de la infección, generando el huésped una acumulación de macrófagos y células del sistema inmune que da lugar a una necrosis caseosa, tejido muerto con la presencia de pus que intenta aislar al bacilo. Todo esto provoca la llegada de fibroblastos alrededor, dando una fibrosis, que desemboca en la formación de un granuloma. Este granuloma hace que se aisle al bacilo de Koch pero como consecuencia, el tejido pulmonar se vuelve un tejido fibrótico, disminuyéndose la capacidad respiratoria del pulmón. Cualquier golpe de tos puede hacer que el granuloma se rompa liberándose los bacilos a las vías aéreas y favoreciendo que el individuo infecte a otros. La bacteria se replica en el granuloma y si la carga bacteriana es muy alta, el granuloma ya no puede contener más la infección y la bacteria se disemina a otros órganos incluyendo el cerebro. En esta fase, la bacteria puede entrar en el torrente sanguíneo o volver a entrar en el tracto respiratorio para ser liberada, por lo que el huésped es ahora infeccioso, sintomático y se dice que posee TB activa [2,3].

En la mayoría de los casos, los granulomas caseosos van a terminar cicatrizando por depósito de colágeno alrededor de ellos. Una vez expuesto el sistema inmunológico al bacilo, el paciente queda sensibilizado frente al microorganismo. La enfermedad ya no progresa porque los gérmenes quedan en el interior de los granulomas rodeados por el colágeno, sin embargo, pueden quedar bacterias viables dando lugar a una TB latente. La reactivación de los bacilos latentes se asocia con frecuencia con la inmunodeficiencia, por ejemplo en enfermos coinfectados con el VIH, pero aún no se han dilucidado plenamente los mecanismos concretos de la reactivación. La pro-

fundización en la inmunología de la reactivación es vital para el diseño racional de futuras vacunas y fármacos antituberculosos [1,2,3].

3. TRATAMIENTO

El tratamiento actual para tratar la TB tiene una duración de 6 meses y posee una tasa de curación de más del 90% cuando se administra siguiendo una terapia directamente observada (método en el cual un profesional observa cómo cada paciente se toma las dosis de los medicamentos recetados para así asegurar que está recibiendo el tratamiento de manera correcta). Este tratamiento se divide en dos fases. Los dos primeros meses se corresponden con la fase "intensiva" del tratamiento, en la que se utilizan 4 fármacos: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Los 4 meses posteriores, corresponden a la fase de continuación, en la que solo se administra isoniazida y rifampicina [4]. Esta pauta de tratamiento es ampliamente utilizada para tratar la TB pulmonar en todo el mundo, sin embargo, presenta dos problemas principales. En primer lugar, ya que es un tratamiento que se prolonga durante un periodo de tiempo relativamente largo, muchos de los pacientes no siguen las pautas de manera correcta o abandonan el tratamiento antes de tiempo. Para solucionar este problema, se está aplicando cada vez más la terapia directamente observada que se explicó anteriormente, para así asegurar la correcta administración de todos los fármacos. En segundo lugar, se han registrado reacciones adversas frente a estos medicamentos, principalmente hepatotoxicidad, desórdenes gastrointestinales o respuestas alérgicas, por lo que se necesita una mayor investigación para poder desarrollar nuevos medicamentos o mejorar los existentes y así evitar estos posibles efectos adversos [5].

Aunque el nivel de éxito de esta terapia es muy alto en pacientes con TB sensible a fármacos, el éxito de este tratamiento es bastante menor en pacientes con TB farmacorresistente (TB-MR) [5]. Este tipo de TB se define como aquella resistente a la isoniazida y la rifampicina, con o sin resistencia a otros fármacos de primera línea. Sin embargo, en los últimos años han aparecido casos de pacientes con TB en los que ningún fármaco era efectivo para combatir la infección. Este tipo de TB se ha denominado TB totalmente resistente (TB-TR) y es causada por cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a todos los fármacos disponibles. Por lo tanto, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios para desarrollar nuevos fármacos o modificar algunos ya existentes para poder tratar estos tipos de TB resistentes [4].

Para que un nuevo fármaco sea considerado como candidato para tratar la TB, debe cumplir una serie de requisitos. Además de ser seguro, tiene que ser más potente que los fármacos ya existentes para así poder reducir la duración de las terapias, debe inhibir nuevas dianas para que puedan ser tratados los tipos de TB resistentes, deben ser compatibles con la terapia antirretroviral, ya que muchos pacientes están también coinfectados con el VIH, y no pueden ser antagonistas de otros fármacos usados para tratar la TB.

Tras 5 décadas de inactividad en el desarrollo de nue-

vos fármacos contra la TB, en los últimos 10 años han surgido nuevos compuestos y estrategias para tratar esta enfermedad (Figura 1). Combinando estos nuevos fármacos con los ya existentes, se pueden desarrollar tratamientos que sean mejor tolerados por los pacientes y que tengan una duración menor.

Muchos de los candidatos que están actualmente en ensayos preclínicos son fármacos que en su momento fueron desarrollados para tratar otras enfermedades infecciosas. Entre estos fármacos se encuentran las fluoroquinolonas, rifamicinas, oxazolidinonas y rimirinofenazinas, compuestos que inicialmente se desarrollaron para tratar otras infecciones pero que actualmente están siendo readaptados para tratar la TB [4].

Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas se usan frecuentemente para el tratamiento de la TB-MR como fármacos de segunda línea y tienen como diana la girasa y topoisomerasa del ADN de varios tipos de bacterias [4]. Entre estos fármacos encontramos el levofloxacin, moxifloxacin y gatifloxacin [5]. Se ha sugerido que estos compuestos puedan ser utilizados como fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB debido al potencial que tienen para reducir la duración de la terapia en modelos murinos de TB. El moxifloxacin y gatifloxacin están actualmente en fase III y se están realizando ensayos con ellos para verificar si la TB sensible a fármacos se puede tratar de manera efectiva en un periodo de tiempo más corto [4]. Los estudios realizados con estos fármacos han demostrado que no presentan interacciones indeseables con los antirretrovirales, por lo que podrían ser usados para tratar la TB en pacientes con VIH. Sin embargo, se ha visto que provocan diversos efectos secundarios en niños y mujeres embarazadas, por lo que su utilización está limitada [6].

Rifamicinas

La rifampicina ha sido el tratamiento quimioterapéutico por excelencia para tratar la TB durante 40 años. Este compuesto tiene como diana la subunidad beta de la ARN polimerasa, impidiendo por lo tanto que se produzca la transcripción. Un derivado de la rifampicina es la rifapentina, otra rifamicina que actúa de la misma forma pero tiene una media vida mucho más larga que la rifampicina, permitiendo esto que los tratamientos puedan tener una duración menor [4]. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos en fase II y III para averiguar la dosis exacta de rifampicina que los pacientes deben tomar para poder acortar la duración del tratamiento, dosis que serían mayores a los 600 mg al día que se aconseja hoy en día [4,5].

Sin embargo, el principal inconveniente que presentan las rifamicinas es que inducen al citocromo p450 y otras enzimas que metabolizan fármacos en el hígado, lo que produce interacciones fármaco-fármaco con agentes retrovirales y otros fármacos para el tratamiento de la TB como la bedaquilina. Esto supone un problema para el tratamiento de la TB en pacientes con VIH, particularmente para aquellos a los que se les administre una terapia con inhibidores de proteasas [4].

Clofazimina

La clofazimina es un fármaco con propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias que se usa para el tratamiento de la lepra [7]. Varios estudios que usaron este fármaco para el tratamiento de la TB activa y latente demostraron que podía jugar un papel importante en el tratamiento de la TB-MR. La administración de clofazimina mediante aerosol usando micropartículas también resultó efectivo en el tratamiento de la TB en modelos murinos. Además, esta ruta de administración puede reducir los efectos gastrointestinales y dermatológicos adversos de la clofazimina. Por lo tanto, se necesita más investigación para encontrar la dosis óptima de clofazimina, la duración del tratamiento y la vía de administración más correcta [4,5].

Oxazolidinonas

Las oxazolidinonas son fármacos que inhiben la síntesis de proteínas uniéndose al ARN ribosómico 23S de la subunidad ribosómica 50S de las bacterias. Entre estos fármacos encontramos el Linezolid, una oxazolidinona de primera generación que ha demostrado ser efectiva contra la TB-MR. Sin embargo, este fármaco produce efectos secundarios como neuropatía, mielosupresión, trombocitopenia o neuritis óptica, entre otros. Para evitar estos problemas, se ha desarrollado el fármaco Sutezolid (PNU-100480), un análogo del Linezolid que tiene una mayor actividad bactericida y que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase III [4]. Al contrario que en el caso del Linezolid, el Sutezolid parece tener actividad esterilizante, un factor clave para el éxito del tratamiento contra la TB [6]. Todos estos prometedores datos hacen que se estén desarrollando nuevas terapias combinadas y fármacos, por ejemplo, AZD5847, una oxazolidinona bactericida y que actúa como el linezolid. Se ha demostrado que este fármaco no es antagonista de ningún otro utilizado para el tratamiento de la TB y actualmente, se encuentra en ensayos clínicos de fase II [4,5].

Meropenem y clavulanato

M.tuberculosis es resistente a los antibióticos β -lactámicos como el meropenem, ya que produce una β -lactamasa eficiente, BlaC, que los hidroliza. Se ha demostrado que la inhibición de BlaC por clavulanato podría convertir a *M.tuberculosis* sensible al meropenem. Este antibiótico actúa inhibiendo la actividad carboxipeptidasa, interrumpiendo por tanto la biosíntesis de peptidoglicano. Tanto el meropenem como el clavulanato son fármacos aprobados cuya combinación se ha utilizado para tratar pacientes con TB-MR [4,5].

4. NUEVOS FÁRMACOS

Bedaquilina

La bedaquilina (TCM207) es una diarilquinolona que ha sido aprobada recientemente para el tratamiento de la TB. Este fármaco actúa inhibiendo la subunidad c de la ATP sintasa, disminuyendo los niveles intracelulares de ATP, ya que impide la translocación de protones requerida para la síntesis de ATP. La sintasa de ATP mitocondrial humana es mucho menos sensible a la bedaquilina que la de las micobacterias, por lo que este fármaco es bien tole-

rado por el organismo. Una característica importante de la bedaquilina es que actúa tanto sobre los bacilos de la TB activa como la TB latente. Esto se debe a que la síntesis de ATP de novo es esencial para viabilidad de la micobacteria en estado latente. Además, la bedaquilina mata tanto a las cepas susceptibles a fármacos como las resistentes [4,5]. En ensayos de fase II en pacientes con TB-MR, la bedaquilina era muy efectiva y reducía el tiempo de respuesta a más de la mitad cuando se administraba junto con un régimen de tratamiento, comparado con la administración del tratamiento sin bedaquilina [6]. Otra propiedad destacable de este fármaco es que tiene una vida media inusualmente larga, suponiendo esto una característica muy interesante para la introducción de este fármaco en un régimen intermitente. Sin embargo, la bedaquilina también presenta inconvenientes, como son su potencial de inducir arritmias y su acumulación en los tejidos [4]. A pesar de esto, la bedaquilina representa un potente fármaco para el tratamiento de la TB y TB-MR, así como para intentar reducir la duración de los tratamientos, por lo que actualmente se sigue investigando en el desarrollo de este fármaco.

Nitroimidazoles

Los compuestos nitroimidazoles, como el clásico metronidazol, se utilizaron para el tratamiento de la TB debido a su actividad contra microorganismos anaeróbicos, ya que la anaerobiosis es una característica principal de la TB latente. De hecho, se ha comprobado que el metronidazol elimina la bacteria *M.tuberculosis* bajo condiciones de hipoxia *in vitro* pero no en condiciones de aerobiosis. En un estudio reciente realizado en macacos que padecían TB latente, el metronidazol previno su reactivación. Además, cuando se usó en combinación con isoniazida y rifampicina, ayudó a acortar la duración del tratamiento requerido para curar la TB activa en estos monos [4,5].

Se están desarrollando dos nuevos fármacos de la familia de los nitroimidazoles: PA-824 y OPC67683 (conocido como delamanida). Al igual que el metronidazol, ambos son pro-fármacos. PA-824 es activado intracelularmente por una nitroreductasa (Ddn) presente en *M.tuberculosis*, por lo tanto la actividad de este pro-fármaco se restringe a este complejo, siendo inactivo en estirpes como *M.leprae*,

donde el gen de la nitroreductasa se ha eliminado de su genoma. La forma activa de PA-824 puede generar especies reactivas de nitrógeno como el NO, que es el efector principal en la eliminación de las bacterias de forma anaeróbica. Muchos mutantes de *M.tuberculosis* resistentes a PA-824 que se producen en el laboratorio, presentan la nitroreductasa inactiva. Estos mutantes presentan resistencia cruzada a la delamanida y a otros compuestos como las nitrofuramilamidas, lo que sugiera que la nitroreducción es un mecanismo de activación común para los fármacos nitroaromáticos en *M.tuberculosis*. Se ha sugerido que el mecanismo aeróbico a través del cual PA-824 elimina a las bacterias es mediante la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos necesarios para formar la pared celular, mientras que en el mecanismo anaeróbico eliminaría a las bacterias debido a la liberación de NO [4,5,6].

La delamanida es un nitro-dihidro-imidazooxazol cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la biosíntesis de los ácidos metoxi-micólicos y ceto-micólicos, dos componentes esenciales de la pared celular de las micobacterias [5]. Al igual que en el caso de PA-824, la delamanida para activarse necesita una nitroreducción por parte de la nitroreductasa Ddn. Además, la delamanida, más potente que PA-824, también elimina a las bacterias mediante la producción de NO [4]. Este fármaco ha mostrado una potente actividad bactericida contra *M.tuberculosis* y no produce resistencia cruzada ni antagoniza la acción de rifampicina, etambutol o isoniazida. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos de Fase III y varios estudios han comprobado su eficacia tanto *in vivo* como *in vitro* en cepas resistentes, por lo que actualmente se propone también como una potente estrategia para el tratamiento de la TB-MR [5].

SQ109

El etambutol es el componente más débil del tratamiento farmacológico usado contra la TB y por lo tanto, se está intentando reemplazarlo por otro fármaco más efectivo. Para ello, se sintetizaron derivados de diaminas más potentes usando la química combinatoria y mediante esta técnica se obtuvo el compuesto SQ109, un análogo de la 1,2-etilendiamina que se encuentra actualmente en ensa-

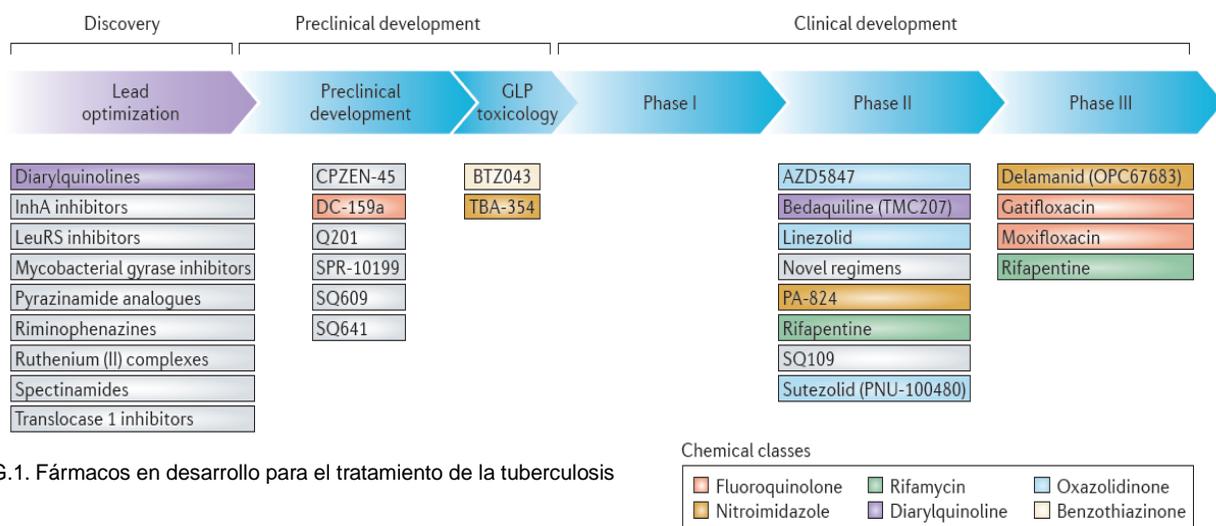


FIG. 1. Fármacos en desarrollo para el tratamiento de la tuberculosis

yos clínicos de Fase II. Este compuesto tiene como diana la proteína MmpL3, que es una proteína esencial de membrana perteneciente a la familia de resistencia, nodulación y división (RND). El papel de esta proteína es transportar trehalosa monomicolato al interior de la envuelta celular bacteriana y SQ109 actúa inhibiendo la síntesis del ácido micólico. Se ha demostrado que combinando la bedaquilina con este compuesto, se produce un efecto de sinergia, aumentando el potencial bactericida. Este efecto se debe a que SQ109 debilita la pared celular y permite a la bedaquilina que llegue hasta la ATP sintasa de manera más eficiente [4].

Benzotiazinonas

Las benzotiazinonas son uno de los inhibidores de *M.tuberculosis* más potentes descubiertos hasta la fecha. Uno de los compuestos de esta familia descubiertos actualmente es BTZ043, que se encuentra en ensayos preclínicos. Este candidato preclínico ha demostrado una eficacia comparable con la isoniazida y la rifampicina y es activo tanto para la TB susceptible a fármacos como para la MR-TB. Además, cuando se utilizaba BTZ043 combinado con otros fármacos para tratar la TB como la bedaquilina, se observaba un efecto sinérgico [4,5].

La diana de las benzotiazinonas es la enzima decaprenil fosforil-beta-D-ribose 2'- epimerasa (DprE1), que cataliza la conversión de la decaprenil-fosforil-D-ribose hacia de caprenil-fosforil-D-arabinosa, que es el precursor para la síntesis del arabinogalactano y lipoarabinomanano que componen la pared celular de las micobacterias. El compuesto BTZ043 experimenta una nitroreducción hacia un compuesto que se une covalentemente a un residuo de cisteína en el sitio activo de la enzima, inactivando irreversiblemente a DprE1 [4].

Se han identificado otros compuestos nitroaromáticos que son inhibidores de DprE1 y todos ellos tienen como diana el mismo residuo de cisteína que BTZ043. Estos compuestos son las dinitrobenzamidias (DNB1), benzoxiquinoxalinas (VI-9376) y triazol 377790. Por lo tanto, DprE1 parece ser una diana vulnerable de *M.tuberculosis*, por lo que se necesita más investigación para poder encontrar otros inhibidores nitroaromáticos de esta enzima que sean efectivos en el tratamiento de la TB [4,5].

5. CONCLUSIÓN

La TB es una enfermedad que afecta a países de todo el mundo y que, aunque parecía controlada, ha resurgido en los últimos años, suponiendo una importante amenaza a nivel mundial. Tras un largo periodo de tiempo de más de 40 años en el que no se había avanzado en el tratamiento de esta enfermedad, actualmente se están desarrollando numerosos fármacos y estrategias para combatirla.

El propósito de las investigaciones que se están llevando a cabo es crear regímenes de tratamiento más cortos, menos tóxicos y cuya eficacia y seguridad puedan ser evaluadas en un menor periodo de tiempo. Además, debido a la aparición de cepas multirresistentes de *M.tuberculosis*, es urgente desarrollar nuevos fármacos para los cuales este microorganismo no presente resisten-

cia y así poder tratar dos formas muy agresivas de la TB: la TB multirresistente y la totalmente resistente. Para ello, muchas organizaciones a nivel mundial están colaborando para encontrar la combinación de fármacos adecuada para tratar las distintas variantes de esta enfermedad, en lugar de centrar sus esfuerzos en el descubrimiento de un único fármaco. Aunque se han realizado numerosos avances y muchos de los fármacos descubiertos se encuentran en las últimas fases de los ensayos clínicos, se necesita seguir investigando para poder desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y encontrar dianas específicas de *M.tuberculosis*.

REFERENCIAS

- [1] M. Pai, M. Behr, D. Dowdy. "Tuberculosis," Nature Reviews Disease Primers, vol 2, p. 1-23, 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.76
- [2] G. Walzl, K. Ronacher, W. Hanekom, and T.J. Scriba, T. J. Immunological biomarkers of tuberculosis. Nature Reviews Immunology, vol. 11, no 5, p. 343-354, 2011, doi: 10.1038/nri2960
- [3] G. Delogu, M. Sali, G. Fadda, U. Cattolica, P. Giovanni... "The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection," Mediterranean Journal Hematology Infectious Disease, vol 5, no 1, 2013, doi: 10.4084/mjihid.2013.070.
- [4] A. Zumla, P. Nahid, and S.T. Cole. "Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens," Nature Reviews Drug Discovery, vol 12, no 5, p. 388-404, 2013, doi: 10.1038/nrd4001
- [5] M. AlMatar, H. AlMandea, I. Var, B. Kayar and F. Köksal. B. "New drugs for the treatment of Mycobacterium tuberculosis infection," Biomedicine & Pharmacotherapy, vol 91, p. 546-558, 2017, doi:10.1016/j.biopha.2017.04.105
- [6] S. Swindells. "New drugs to treat tuberculosis," F1000 Medicine Reports, Rrports, vol 7, p. 1-7, 2012, doi: 10.3410/M4-12
- [7] R.S., Wallis, M. Maeurer, P. Mwaba, J. Chakaya, R. Rustomjee, G.B. Migliori, A. Zumla. "Tuberculosis-advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers," The Lancet Infectious Diseases, vol 16, no 4, p. 34-36, 2016, doi:10.1016/S1473-3099(16)00070-0



-Ana Guzmán Serrano recibió el título de Graduada en Bioquímica por la Universidad de Sevilla en 2016. Actualmente es estudiante del primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Ocrelizumab, nuevo fármaco contra la esclerosis múltiple

Antonio Javier Sánchez Díaz

Resumen—La esclerosis múltiple es la enfermedad inmunológica más común en la población mundial, que a día de hoy no tiene cura. Recientemente se ha descubierto el papel de los linfocitos B en el desarrollo de esta enfermedad abriendo el campo a nuevas líneas de investigación. Un nuevo fármaco desarrollado por Roche/Genentech dirige su diana terapéutica a las moléculas CD20 que se expresan en los linfocitos B. Este nuevo fármaco, llamado Ocrelizumab, ha demostrado ser el primer compuesto que consigue actuar sobre la esclerosis múltiple progresiva de manera eficaz, además, ha mostrado actividad en personas con esclerosis múltiple remitente-recurrente reduciendo el número de brotes y reduciendo la tasa de progresión de manera más eficaz que otros tratamientos existentes.

Palabras Claves— Ocrelizumab, Ocrevus, esclerosis múltiple, terapias anti CD20.

1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inmunológica del sistema nervioso central (SNC) que afecta a 2,5 millones de personas en el mundo, siendo una de las enfermedades neurológicas más comunes en la población. Esta enfermedad no es contagiosa, ni hereditaria, ni mortal y puede producir diversos síntomas como alteraciones visuales y cognitivas, dolor, dificultades a la hora de hablar, etc. Estos síntomas limitan la calidad de vida de la persona afectada y de su entorno, ocasionando un gran impacto social. Hasta ahora no se conoce la causa de origen de esta enfermedad ni tampoco se conoce su cura, de ahí que las industrias farmacéuticas estén interesadas en el desarrollo y búsqueda de fármacos que proporcione una cura para esta enfermedad. A día de hoy existen diversos fármacos que ayudan a paliar algunos síntomas de los diferentes tipos de EM. Actualmente se cuenta con un tratamiento innovador para la EM comercializado por Roche/Genentech aprobado el 28 de Marzo de 2017 por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) llamado Ocrelizumab, siendo el primer fármaco eficaz en un ensayo tipo III para la esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP).

2. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Como he comentado anteriormente la EM es una enfermedad del SNC. Las fibras nerviosas del SNC se encuentran protegidas por un material compuesto por proteínas y grasa llamado mielina. La mielina facilita la conducción de los impulsos nerviosos eléctricos entre fibras nerviosas aumentando la velocidad de conducción por un mecanismo llamado conducción saltatoria.

En la EM se produce pérdida de mielina en múltiples áreas, ocasionando cicatrices (esclerosis) o placas de desmielinización. Esta pérdida de mielina produce una interrupción en la transmisión del impulso eléctrico desde y

hacia el cerebro que da lugar a la aparición de los síntomas. La EM se caracteriza por existencia de inflamación, desmielinización, cicatrización glial y daño neuroaxonal, produciendo diferentes grados de lesión neurológica. Produce frecuentemente episodios de disfunción neurológica que duran varios días o semanas y se conocen como brotes, que normalmente suelen remitir parcial o totalmente sobre todo en las etapas iniciales de la enfermedad. El primer episodio es conocido como síndrome desmielinizante aislado que produce afectación medular, visual o troncocefálica. A medida que avanza la enfermedad disminuye la frecuencia de brotes y se produce una fase de deterioro progresivo.

La EM es una enfermedad que tiene dos aspectos bien definidos: en el primer año se dan brotes aislados producidos por un proceso inflamatorio autoinmune y observable por resonancia magnética (RM) como lesiones desmielinizantes que afectan tanto a la sustancia blanca como a la gris. El segundo aspecto es un daño degenerativo relacionado con la producción de daño irreversible en axones y neuronas, que existe desde las primeras etapas pero que cobra relevancia [1].

La EM posee cuatro tipos diferentes: forma recurrente-remitente (EMRR), forma progresiva secundaria (EMSP), forma progresiva primaria (EMPP) y forma progresiva recidivante (EMPR) [2].

- Forma remitente-recurrente (EMRR) afecta a más del 80% de las personas con EM donde se producen lesiones inflamatorias en el SNC. Los brotes son imprevisibles y pueden aparecer en cualquier momento.

- Forma progresiva secundaria (EMSP) afecta de entre 30% a un 50% de los pacientes que sufren inicialmente EMRR. En este tipo el grado de discapacidad persiste o empeora entre brotes.

- Forma progresiva primaria (EMPP) afecta al 10% de todos los pacientes con EM. Se caracteriza por ausencia de brotes definidos, pero hay un comienzo lento y un empeoramiento constante de los síntomas sin un periodo intermedio de remisión.

- Forma progresiva recidivante (EMPR) es la forma más atípica, que a diferencia de los EMPP, hay progresión desde el comienzo y muestran brotes agudos claros, con o sin recuperación completa.

3. PAPEL DE LOS LINFOCITOS B

Hasta hace relativamente poco, se pensaba que el proceso de inflamación en la EM estaba principalmente mediada por las células T CD4 proinflamatorias (Th17) productoras de IL-17 [3]. Las células B pueden contribuir a esta enfermedad a través de mecanismos dependiente de anticuerpos como mecanismos independientes de anticuerpos. Las células B pueden diferenciarse a células plasmáticas y son capaces de producir autoanticuerpos dirigidos contra el SNC, desencadenando por tanto efectos citotóxicos celulares y efectos citotóxicos dependientes del complemento. Además, las células B pueden funcionar como células presentadoras de antígenos y pueden modular las funciones de las células T efectoras. Esta interacción simultánea de las células B y T específicas de antígeno aumentan la respuesta inmune y promueven la enfermedad. Se ha comprobado que pacientes con EM poseen una secreción anormal de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias por parte de las células B [4].

4. TERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA CD20

Debido al papel de los linfocitos B en el desarrollo de la EM, la industria farmacéutica ha puesto sus objetivos en desarrollar nuevos fármacos contra este tipo de células. La molécula CD20 se expresa en la mayoría del linaje de las células B humanas, desde las células Pre-B, células B inmaduras hasta las células B de memoria, pero no en las células madre, células pro-b o células plasmáticas diferenciadas que producen anticuerpos dirigidos contra patógenos previamente encontrados. La estrategia que han seguido es fabricar varios anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD20 y así agotar las células B mediante mecanismos de citotoxicidad dependiente del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos e inducción de apoptosis en las células B que lo expresan [5] [6].

5. NUEVO FÁRMACO OCRELIZUMAB

Ocrelizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante dirigido contra las células B que expresan CD20. Ocrelizumab es una inmunoglobulina glicosilada G1 (IgG1) con una masa molecular de aproximadamente 145 KDa.

5.1. Ocrelizumab vs Rituximab: dos terapias contra linfocitos CD20

Actualmente se dispone de dos anticuerpos monoclonales anti CD20: Rituximab y Ocrelizumab. Ambos han demostrado que la terapia anti CD20 agota agudamente las células CD20+ en la periferia. Además ambos reducen la inflamación según se ha determinado por resonancia magnética [7]. Comparado con el Rituximab, el Ocrelizumab se asocia con un aumento de los efectos citotóxicos mediados por células dependientes de anticuerpo y reduce

los efectos citotóxicos dependiente del complemento. Además la principal diferencia es que Ocrelizumab es una inmunoglobulina humanizada, al contrario que Rituximab que es una molécula quimera, lo que hace a Ocrelizumab menos inmunogénico y un perfil de riesgo beneficioso más favorable que el Rituximab [4] [5].

5.2. Propiedades farmacológicas de Ocrelizumab

Ocrelizumab ha sido aprobado para su uso por la FDA el 28 de Marzo de 2017. Ocrelizumab se comercializa bajo el nombre de OCREVUS™ [8].

5.2.3 Farmacodinámica

Para los estudios de Farmacodinámica se llevó a cabo el recuento de las células CD19+ ya que OCREVUS interfiere con las células CD20. El tratamiento con OCREVUS reduce el número de células B CD19 + en sangre hasta dos semanas después de la administración. En un estudio clínico realizado con alrededor de 50 pacientes se comprobó que el tiempo medio para que las células B volvieran a su estado basal fue de 72 semanas (rango 27-175 semanas) después de su última administración [8].

5.2.3 Farmacocinética

En los estudios clínicos con pacientes enfermos de EM, las dosis de Ocrelizumab fue de 600 mg cada 6 meses (pacientes EMRR) o dos infusiones de 300 mg separadas por 14 días cada 6 meses (pacientes con EMPP). La concentración máxima media fue de 212 mcg / ml en pacientes con EMRR (600 mg de infusión) y 141 mcg / mL en pacientes con EMPP (dos infusiones de 300 mg administradas en dos semanas). La farmacocinética del Ocrelizumab fue esencialmente lineal y proporcional a la dosis entre 400 mg y 2000 mg. EL volumen central de distribución de la población farmacocinética fue de 2,78 L. El aclaramiento constante fue estimado en 0,17 L / día y el aclaramiento inicial dependiente del tiempo fue estimado en 0,05L/día, el cual disminuyó con una vida media de 33 semanas. La semivida de eliminación terminal fue de 26 días [8].

6. ESTUDIOS FUNDAMENTALES FASE III DE OCRELIZUMAB

Se han llevado a cabo tres estudios diferentes en fase tres que probaban la eficacia de Ocrelizumab; OPERA I, OPERA II y ORATORIO.

6.1. Estudios fase III Opera I y Opera II

En estos estudios se comparaba la eficacia y la seguridad de Ocrelizumab frente a un tratamiento ya existente basado en interferón β -1a en pacientes con forma recidivantes de EM que engloba a EM remitente-recurrente y EM secundaria progresiva con recaídas.

La forma de administración de ambos fármacos fue en dosis de 600mg administradas por infusión intravenosa cada seis meses en caso de Ocrelizumab y 44 microgramos administrados por inyección subcutánea tres veces a la semana en el caso de interferón β -1a.

Los resultados obtenidos de estos estudios son verda-

deramente sorprendentes. Ocrelizumab redujo significativamente la tasa por año de recaídas respecto al interferón β -1a. Esta reducción fue del 46% y el 47% en los estudios OPERA I y OPERA II respectivamente ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$). Además, Ocrelizumab consiguió una reducción sostenida durante 12 semanas en el riesgo de la pérdida de capacidades físicas del 43% y el 37% con respecto al interferón β -1a en los estudios OPERA I y OPERA II respectivamente ($p = 0,0139$ y $p = 0,0169$). Así mismo, esta reducción sostenida en el riesgo de pérdida de capacidades física se prolongó durante 24 semanas en un 43% y el 37% con respecto al interferón β -1a en los estudios OPERA I y OPERA II respectivamente ($p = 0,0278$ y $p = 0,0370$). En comparación con el interferón β -1a, el Ocrelizumab redujo significativamente en un 94% y 95% en OPERA I y OPERA II respectivamente la inflamación y lesiones cerebrales agudas relacionadas con la EM a las 24, 48 y 96 semanas y en un 77% y 83% en OPERA I y OPERA II respectivamente la aparición o crecimiento de lesiones cerebrales crónicas relacionadas con la EM a las 24, 48 y 96 semanas ($p < 0,0001$ y $p < 0,0001$) [6].

Por tanto queda demostrado que Ocrelizumab es capaz de reducir significativamente la tasa anual de recaídas, además de reducir significativamente la tasa de progresión de la discapacidad y lesiones cerebrales asociada a la EM más eficazmente que el tratamiento con interferón β -1a.

6.2. Estudios fase III Oratorio

En este estudio se evalúa la seguridad de Ocrelizumab en comparación con un placebo en 732 pacientes con esclerosis múltiple progresiva primaria durante al menos 120 semanas.

El porcentaje de pacientes con progresión de discapacidad a las 12 semanas fue de 32,9% con Ocrelizumab frente a 39,3% con placebo (hazard ratio, 0,76; intervalo de confianza del 95% [IC], 0,59 a 0,98; $p = 0,03$). El porcentaje de pacientes con progresión de discapacidad confirmada a las 24 semanas fue de 29,6% con Ocrelizumab versus 35,7% con placebo (hazard ratio, 0,75; IC del 95%: 0,58 a 0,98; $P = 0,04$). A la semana 120, el valor T25-FW (tiempo requerido para caminar 25 pies, equivalentes a unos 7,6 metros) empeoró en un 38,9% con Ocrelizumab versus 55,1% con placebo ($P = 0,04$). En pacientes tratados con Ocrelizumab, el volumen de las lesiones hiperintensas en medida por resonancia magnética disminuyó un 3,4% a las 120 semanas mientras que los que recibieron un placebo aumentó un 7,4% ($p < 0,001$). El Ocrelizumab también redujo un 17,5% respecto al placebo la tasa de pérdida total de volumen cerebral tras 120 semanas ($p = 0,0206$). Los acontecimientos adversos provocados por Ocrelizumab y el placebo fueron muy similar en los dos grupos (95,1 % frente a 90,0 % respectivamente) y se debió principalmente a la aparición de reacciones relacionadas con la infusión. La proporción de pacientes del grupo del Ocrelizumab que sufrieron acontecimientos adversos graves, incluidas infecciones graves, también fue similar a la registrada con el placebo (20,4 % y 22,2 % respectivamente) [9].

Estos resultados demuestran que Ocrelizumab es capaz

de reducir la progresión de la enfermedad y reducir el volumen de lesiones en pacientes con la forma más grave de EM.

7. CONCLUSIONES

La EM es considerada actualmente como una de las enfermedades neurológicas más frecuente en la población mundial, siendo la esclerosis múltiple progresiva primaria la forma más peligrosa. Ocrelizumab ha demostrado ser el primer compuesto que consigue actuar sobre la esclerosis múltiple progresiva de manera eficaz. Aunque no solo actúa en la EMPP, sino que también actúa en personas con esclerosis múltiple remitente-recurrente reduciendo el número de brotes y reduciendo la tasa de progresión más eficazmente que el tratamiento con interferón β -1a. Por tanto Ocrelizumab es el primer tratamiento que puede ser usado para tratar diferentes formas de esclerosis múltiple que abarca el 90% de todos los casos (80% EMRR y 10% EMPP), siendo una esperanza para los pacientes que padecen esta enfermedad.

REFERENCIAS

- [1] A. García Merino, J. Ramón Ara Callizo, O. Fernández Fernández, L. Landete Pascual, E. Moral Torres, and A. Rodríguez-Antigüedad Zarrantz, "Consensus statement on the treatment of multiple sclerosis by the Spanish Society of Neurology in 2016," *Neurología*, vol. 32, no. 2, pp. 113-119, 2016.
- [2] "Qué es la Esclerosis Múltiple · Esclerosis Múltiple España." [Online]. Available: <http://www.esclerosismultiple.com/esclerosis-multiple/que-es/>.
- [3] J. Furuzawa-Carballeda, M. I. Vargas-Rojas, and A. R. Cabral, "Autoimmune inflammation from the Th17 perspective," *Autoimmun. Rev.*, vol. 6, no. 3, pp. 169-75, Jan. 2007.
- [4] L. Kappos *et al.*, "Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial," *Lancet*, vol. 378, no. 9805, pp. 1779-1787, 2011.
- [5] R. Milo, "Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis," *Autoimmun. Rev.*, vol. 15, no. 7, pp. 714-718, 2016.
- [6] S. L. Hauser *et al.*, "Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis," *N. Engl. J. Med.*, 2016.
- [7] R. Hohlfeld and E. Meinl, "Ocrelizumab in multiple sclerosis: markers and mechanisms," *Lancet Neurol.*, vol. 16, no. 4, pp. 259-261, 2017.
- [8] "INDICATIONS AND USAGE OCREVUS. Highlights of prescribing information 2017.
- [9] X. Montalban *et al.*, "Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis," *N. Engl. J. Med.*, 2016.



Antonio Javier Sánchez Díaz recibió el título de Graduado en Biología por la Universidad de Sevilla en 2016. Actualmente es estudiante del primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria por la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Biolixiviación y su aplicación en las aguas residuales

Constanza Espinosa Laserna

Resumen—Los actuales requerimientos de la sociedad han impulsado el desarrollo de nuevas técnicas para la extracción de metales, este es el caso de la biolixiviación. Esta práctica supone un gran avance tanto económicamente como ambientalmente. Además de las posibles aplicaciones en materia de metalurgia uno de los usos más importantes que se hace de la biolixiviación es la limpieza de metales pesados presentes en los lodos procedentes de las aguas residuales. En este artículo revisamos algunos de los estudios más importantes realizados en este campo.

Palabras Claves— Aguas residuales, Biolixiviación, Lodos, Metales, Microorganismos

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los requerimientos de la sociedad hacen que los procesos para extraer minerales se hayan encarecido por la mayor mano de obra y por las necesidades energéticas y que además las reservas de dichos compuestos se estén agotando. Por estas razones se hacía necesario buscar materias primas minerales diferentes, como es el caso de los sulfuros metálicos. Este tipo de yacimientos son bastante abundantes mundialmente, por lo que cualquier proceso que sirva para poder extraer minerales de estas menas es beneficioso. Los sulfuros son fácilmente extraíbles, mediante las técnicas convencionales, ya que son fácilmente concentrables y porque además el azufre presente en estos minerales proporciona parte de la energía necesaria para llevar a cabo el proceso. Pero una gran desventaja es la producción de grandes cantidades de SO_2 , que participa en el evento de la lluvia ácida. Con el objetivo de disminuir estas emisiones y los costes de las técnicas convencionales surgió la biolixiviación. La biotecnología ha tenido un papel fundamental en las últimas décadas sobre la mejora del proceso de extracción y purificación de los minerales, utilizando la biolixiviación. Las últimas investigaciones se centran en hacer estos procesos menos perjudiciales ambientalmente hablando y en que se pueda llevar a cabo biorremediación de minas mediante la utilización de microorganismos. La biolixiviación junto con la biooxidación forma parte de la biominería, que consiste en la aplicación de procesos biológicos en la industria minera. El primer proceso se refiere al pretratamiento llevado a cabo por un microorganismo que cataliza la degradación de sulfuros de mineral, como la piritita, que normalmente llevan con ellos plata, oro o ambos. Con esto se consigue que la parte valiosa del mineral quede en fase sólida y la solución se descarta. La biooxidación aumenta la exposición del elemento a recuperar, pero no lo solubiliza como ocurre durante los procesos de biolixiviación. En el caso de la biolixiviación esta se

refiere al hecho de usar un microorganismo para la extracción de metales de la fuente mineral. Esto ocurre mediante una reacción química donde el sulfuro se transforma en un sulfato soluble.

Rodríguez *et al* [11] determinan que las ventajas que se le pueden atribuir a la biolixiviación son las siguientes: las condiciones en las que se lleva a cabo son prácticamente las ambientales, los productos que se generan son más compatibles con el medio ambiente, no se produce tanto SO_2 , el gasto energético es mucho menor ya que no hay que secar los minerales ni alcanzar temperaturas altas, se necesitan menos cantidad de sustratos, posibilidad de tratamiento de los residuos generados, etc.

2. MICROORGANISMOS

Con respecto a los microorganismos responsables del proceso de biolixiviación hay que destacar que todos comparten la capacidad de resistir temperaturas, pH y condiciones de vida extremas. En el proceso de biolixiviación los microorganismos pueden llevar a cabo una oxidación directa, mediante una reacción enzimática o una oxidación indirecta, mediante la regeneración del agente lixivante (Fe^{3+}). Las bacterias implicadas son acidófilas y se clasifican, según la temperatura óptima a la que se desarrollan, en mesófilas, extremófilas extremas y extremófilas moderadas.

2.1. Bacterias mesófilas

Dentro de las bacterias mesófilas podemos encontrar organismos autótrofos (utilizan CO_2 como fuente de carbono), heterótrofos (utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbonos) o mixótrofos (pueden usar compuestos orgánicos e inorgánicos). De hecho en los procesos de biolixiviación suelen participar asociaciones de los tres tipos de bacterias mesófilas e incluso protozoos y hongos. Son las bacterias autótrofas las que llevan a cabo la extracción de metales mientras que las heterótrofas y los protozoos disminuyen las concentraciones de compuestos

que inhiben la acción de las autótrofas. Dentro de las bacterias mesófilas encontramos los géneros *Acidiphillum* (heterótrofo), *Thiobacillus* y *Leptospirillum* (ambos autótrofos). Todas ellas crecen a temperaturas comprendidas entre 25 y 35 °C. Dentro del género *Thiobacillus* una de las especies más importantes es *T.ferrooxidans* junto con *T.thiooxidans*. Esta difiere de otras especies del género por su capacidad de usar el ión ferroso como donador de electrones. Al igual ocurre con *Leptospirillum ferrooxidans*. Las bacterias nombradas anteriormente pueden liberar los metales de sulfuros minerales a través de una biolixiviación directa o indirecta. En el caso de la biolixiviación directa debe haber un contacto íntimo entre la bacteria y el mineral [9]. A partir de este método se pueden extraer molibdeno, cobre, estaño, cobalto, plomo, etc.

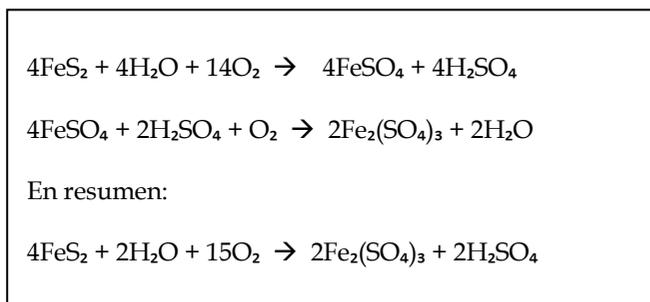


Figura 1. Biolixiviación directa en pirita

En el proceso indirecto, que se aplica a la extracción uranio, el microorganismo genera un lixiviado que oxida al sulfuro. En el caso de ser una solución ácida el lixiviado es el hierro férrico. El hierro ferroso generado se puede reoxidar gracias a la acción de *T.ferrooxidans* o *L.ferrooxidans*. *T.thiooxidans* se encarga de proporcionar las condiciones ácidas necesarias.

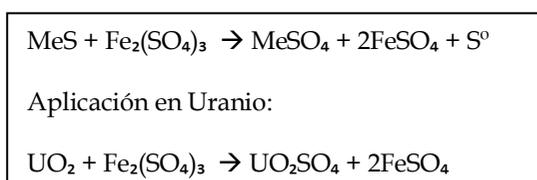


Figura 2. Mecanismo general de biolixiviación indirecto (arriba). Extracción indirecta de Uranio (abajo).

2.2. Bacterias termófilas

Con respecto a las bacterias termófilas, ya hemos visto que se pueden clasificar en extremas o moderadas. Las temperaturas a las que crecen van desde los 45 grados hasta los 90 grados centígrados. El rendimiento de disolución y la velocidad de lixiviación son bastante mayores que en el caso de las bacterias mesófilas, cuando la densidad de la pulpa (mezcla matemática de una porción constituida por sólidos de una granulometría casi uniforme y otra constituida por un líquido, generalmente el agua) es pequeña. Una gran desventaja de las bacterias termófilas extremas es que su membrana da lugar a fenómenos de atrición (rozamiento) lo que ha fomentado la búsqueda de bacterias termófilas moderadas que no tengan este pro-

blema y que además resisten cantidades altas de pulpa. Una de las aplicaciones más importantes de esta lixiviación a altas temperaturas es la extracción de cobre a partir de calcopirita. El género que representa a este conjunto de bacterias en la biolixiviación es *Sulfobacillus*.

3. PROBLEMA ACTUAL DE LAS AGUAS RESIDUALES

En la actualidad uno de los residuos más importantes es el agua residual que dependiendo de la actividad humana que la produzca se denomina de origen industrial, agrícola/ganadero o urbano. En el caso de las aguas industriales es tal la heterogenicidad de las industrias y la toxicidad de los compuestos vertidos que se necesitan de tratamientos previos que disminuyan la concentración de estos antes de llegar a las estaciones depuradoras. Cuando hablamos de aguas procedentes de la agricultura o la ganadería nos referimos a aguas repletas de plaguicidas e insecticidas, además de tener una alta concentración de nutrientes que provocan la eutrofización del terreno. Un hecho a resaltar en las aguas de origen urbano es la presencia de contaminantes emergentes, que provocan efectos nocivos para la salud y el medioambiente y que no están regulados por ley, ya que son relativamente contaminantes nuevos. Entre estos contaminantes emergentes encontramos los productos de higiene personal y los fármacos, que ya hemos nombrado anteriormente.

Origen del agua	Contaminantes
Agrícola/ganadera	Sólidos macroscópicos Materia en disolución Materia en suspensión
Urbana	Organismos patógenos Materia orgánica Grasas y aceites
Industrial	Materia orgánica Sólidos en suspensión Metales pesados

Figura 3. Materias contaminantes más comunes en los distintos tipos de agua residual.

Uno de los contaminantes más importantes de las aguas residuales, sobre todo de origen industrial pero que también puede venir junto con aguas de origen urbano o agrícola, son los metales pesados. Estos quedan retenidos en los lodos que se producen durante la depuración de aguas residuales. Dichos fangos son acumulados y dirigidos a un proceso de compostaje para su posterior uso como fertilizante en campos agrícolas. Si la limpieza de las aguas no es la correcta aparecerán metales pesados en suelos y en las plantas y vegetales que se desarrollen en dichos terrenos. Finalmente esta incorporación de metales pesados a la cadena trófica puede provocar enfermedades crónicas y trastornos metabólicos en seres humanos. Entre

todos los métodos de tratamiento de lodos el más ventajoso a nivel económico y ambiental es la biolixiviación.

4. ESTUDIOS DE BIOLIXIVIACIÓN EN LODOS

En estudios recientes se ha investigado la utilización de cultivos puros de *Thiobacillus ferrooxidans* o *Thiobacillus thiooxidans* y también la posibilidad de usar microorganismos propios de los lodos proporcionando la fuente de carbono adecuada (FeSO_4 , FeSO_2 , S°). De todas estas investigaciones llevadas a cabo se establece que los organismos más extendidos en la limpieza de lodos son los nombrados al principio, *T.ferrooxidans* y *T.thiooxidans*. Esto se debe a que resisten muy bien las condiciones ácidas y pueden oxidar compuestos de azufre y hierro.

Para demostrar los efectos de la biolixiviación en lodos se han llevado a cabo estudios a escala de laboratorio mediante el uso de biorreactores, con el propósito de utilizar, en un futuro, los datos obtenidos a una escala industrial. En un estudio [7] realizado en el que se comparaba la biolixiviación llevada a cabo por *T.ferrooxidans* y FeSO_4 como fuente carbono se observó que a los ocho días, cerca del 60 % de los metales eran solubilizados y que el 90% de los microorganismos desaparecían de los lodos. A continuación se comparo estos resultados con un experimento que usaba *T.ferrooxidans* y *T.thiooxidans* como cultivo mixto se observó que con un pH de 4, a los diez días se conseguía eliminar en torno al 70% de los metales presentes en los lodos procedentes de la digestión anaerobia. En este caso no se utilizó una fuente de carbono externa. El aumento en la solubilización se debe a que el sulfuro producido en la oxidación de los metales es utilizado por *T.thiooxidans* y transformado en ácido que aumenta la solubilización.

Según Villar & García [6] el pH adecuado para todos estos procesos es entre 2 y 3, ya que a estos valores se consigue que la mayoría de metales estén en disolución y además es una condición importante en el crecimiento de las bacterias, que en este caso son acidófilas.

Además del pH otro factor a tener en cuenta es la carga de sólidos del lodo. Si es alta el potencial de oxidoreducción disminuye y esto supone menos solubilización de los metales [5]. A esto hay que añadirle que Cho *et al* [4] concluyeron que los organismos patógenos resisten más tiempo con una alta concentración de sólidos. Tiene que ser, por tanto, una concentración baja para que el proceso se dé óptimamente.

Cuando se estudiaba como afectada los compuestos orgánicos producidos por *T.ferrooxidans* al proceso se concluyó [4] en que a mayor concentración de estos, mayor es el tiempo que se tarda en llevar a cabo la biolixiviación. Aunque se han encontrado [3] bacterias y levaduras (*Brettanomyces*) capaces de utilizar los compuestos producidos y por tanto de disminuir la capacidad inhibitoria de estos. Dentro de las ventajas de la biolixiviación de lodos hay que destacar la eliminación de organismos patógenos y del olor, mediante la disminución, en este último caso de compuestos volátiles [2]. Si nos basamos en el estudio de Couillard *et al* [1], hay que destacar que con respecto a los patógenos se consigue una alta eliminación debido a las condiciones de pH y el ambiente oxidante. Se evita de

esta forma el posible contagio de enfermedades debido al uso de los lodos como fertilizantes.

Por último una vez que tenemos los metales solubilizados en el lixiviado el paso final es la recuperación de esos metales para diferentes aplicaciones. Para ello se utilizan diferentes métodos como pueden ser la adsorción, la precipitación, el uso de disolventes, etc

5. CONCLUSIONES

Por tanto la biolixiviación supone un método alternativo a la extracción convencional de metales a partir de minas. Necesita un menor aporte energético y por tanto requiere menos costes. Además los efluentes producidos en los procesos de extracción utilizando esta técnica son mucho menos contaminantes. También hemos visto que se puede aplicar a la descontaminación por metales pesados de los lodos de aguas residuales. Lodos que cada vez se producen en mayor cantidad y que por tanto es importante que sean materia prima óptima para la producción de fertilizantes, que se puedan usar sin la preocupación de producir toxicidad o enfermedades en los seres humanos.

La única desventaja que conlleva el proceso de biolixiviación es que tarda más en llevarse a cabo que los métodos tradicionales por lo que hay que seguir investigando para modificar las bacterias implicadas con el objetivo de disminuir el tiempo del proceso.

REFERENCIAS

- [1] D. Couillard, M. Chartier, and G. Mercier, "Bacterial leaching of heavy metals from aerobic sludge," *Bioresour. Technol.*, vol. 36, no. 3, pp. 293-302, Jan. 1991.
- [2] F. Shoener and R. D. Tyagi, "Thermophilic microbial leaching of heavy metals from municipal sludge using indigenous sulphur-oxidizing microbiota," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 45, no. 3, pp. 440-446, Apr. 1996.
- [3] D. Fang and L.-X. Zhou, "Enhanced Cr bioleaching efficiency from tannery sludge with coinoculation of *Acidithiobacillus thiooxidans* TS6 and *Brettanomyces* B65 in an air-lift reactor," *Chemosphere*, vol. 69, no. 2, pp. 303-310, Sep. 2007.
- [4] K.-S. Cho, H. W. Ryu, I. S. Lee, and H.-M. Choi, "Effect of solids concentration on bacterial leaching of heavy metals from sewage sludge," *J. Air Waste Manag. Assoc.*, vol. 52, no. 2, pp. 237-43, Feb. 2002.
- [5] Y.-G. Liu, M. Zhou, G.-M. Zeng, X. Li, W.-H. Xu, and T. Fan, "Effect of solids concentration on removal of heavy metals from mine tailings via bioleaching," *J. Hazard. Mater.*, vol. 141, no. 1, pp. 202-208, Mar. 2007.
- [6] L. D. Villar and O. Garcia Jr., "Solubilization profiles of metal ions from bioleaching of sewage sludge as a function of pH," *Biotechnol. Lett.*, vol. 24, no. 8, pp. 611-614, 2002.
- [7] R. D. Tyagi, D. Couillard, and F. Tran, "Heavy metals removal from anaerobically digested sludge by chemical and microbiological methods," *Environ. Pollut.*, vol. 50, no. 4, pp. 295-316, 1988.
- [8] A. Pathak, M. G. Dastidar, and T. R. Sreekrishnan, "Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review," *J. Environ. Manage.*, vol. 90, no. 8, pp. 2343-2353, Jun. 2009.
- [9] L. G. Leduc *et al.*, "The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 2, pp.

103-119, Jun. 1994.

[10] T. Rohwerder, T. Gehrke, K. Kinzler, and W. Sand, "Bioleaching review part A:," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 63, no. 3, pp. 239-248, Dec. 2003.

[11] Y. Rodríguez, M. L. Blázquez, A. Ballester, F. González, J. A. Muñoz, and J. A. Muñoz, "La biolixiviación al comienzo del siglo XXI," *Rev. Metal.*, vol. 37, no. 5, pp. 616-627, Oct. 2001.

[12] Indu Shekhar Thakur, *Environmental Biotechnology. Basics Concepts and Applications*. I.K. International Pvt.Ltd, 2006.

[13] A. T. Lombardi and O. Garcia, "Biological leaching of Mn, Al, Zn, Cu and Ti in an anaerobic sewage sludge effectuated by *Thiobacillus ferrooxidans* and its effect on metal partitioning," *Water Res.*, vol. 36, no. 13, pp. 3193-3202, 2002.



Constanza Espinosa

Laserna recibió el título de Licenciada en Farmacia por la Universidad de Sevilla en 2013. Actualmente cursa el primer año del Máster de Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentario, ofrecido por la Universidad Pablo de Olavide.