

# MOLEQLA <sup>nº</sup> 4 0

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

ISSN 2173-0903

**Portada**

Julio Ezequiel Pérez Carbajo

**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 todas las secciones de la revista**

<b>MoleQla Ambiental</b>	- Ana Martín Calvo
<b>MoleQla Energía</b>	- Juan Antonio Anta Montalvo
<b>MoleQla Nutricional</b>	- Gladys Margot Cahuana Macedo
<b>MoleQla Patrimonio</b>	- María Pilar Ortiz Calderón
<b>MoleQla Farmacéutica</b>	- Matilde Revuelta González
<b>MoleQla Nanotecnológica</b>	- Ana Paula Zaderenko
<b>MoleQla Biotecnológica</b>	- Cristina Guillén Mendoza
<b>MoleQla Celular</b>	- Guillermo López Lluch
<b>MoleQla Relatos</b>	- Jose Manuel Vicent
<b>MoleQla Informática</b>	- Norberto Díaz Díaz
<b>MoleQla Tierra</b>	- Manuel Díaz Azpiroz
<b>MoleQla Médica</b>	- Juan Antonio del Castillo Polo
<b>MoleQla Procesos</b>	- Sara González García
<b>MoleQla Deporte</b>	- Alberto Grao Cruces
<b>MoleQla Forense</b>	- Antonio Aguilar García
<b>MoleQla Instituto</b>	- Almudena García Sánchez
<b>MoleQla Educativa</b>	- Macarena Esteban Ibáñez

**Responsable de Maquetación**

Francisco Araque Frías

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

**Editores**

Juan José Gutiérrez Sevillano  
Ana Martín Calvo



ISSN 2173-0903

Editado el 22 de diciembre de 2020

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

Como viene siendo tradición, cerramos el año con un nuevo número de la revista MoleQla. Este ha sido un año muy diferente que nos ha recordado de la forma más dura que la vida es cambio. Hemos cambiado nuestras costumbres diarias, nuestra forma de trabajar y también la forma de relacionarnos. Ha sido un año muy difícil que nos ha enseñado mucho también. Palabras como COVID o PCR que no formaban parte de nuestro vocabulario ahora las utilizamos prácticamente a diario y hemos pasado de no saber cómo ponernos una mascarilla a que esta se haya convertido en una prenda esencial. Como sociedad, hemos tenido que recurrir más que nunca a la solidaridad, la generosidad, el ingenio y la empatía. Hemos visto que la unión hace la fuerza y hemos asistido atónitos a un logro sin precedentes en lo referente a vacunas.

Despedimos este año de cambios con la esperanza de que en unos meses las diversas vacunas permitirán que de nuevo podamos hacer cambios en nuestra vida. Como no podía ser menos, MoleQla también se ha unido al cambio. Un cambio que ya ha empezado a nivel editorial y que va a dar lugar a una revista que valdrá la pena redescubrir. Tras una década como editora Jefe es el momento perfecto de dar un paso atrás para que así, gente joven y dinámica puedan tomar el control de la revista. Los dos nuevos Editores Jefe, Ana y Juanjo os irán contando las novedades y cambios a lo largo de los próximos números. El resto de los editores, entre los que me incluyo, trabajaremos codo a codo con ellos para que todos vosotros podáis seguir leyendo los artículos de MoleQla muchos años más.



Termino como no podía ser menos deseándoos unas muy felices fiestas y que 2021 nos traiga a todos el cambio que tanto ansiamos.

# ÍNDICE

## **1. Moleq̃a Biotecnología**

- 1.1. Epigenetics: the new key to neurodegenerative disorders
- 1.2. Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental al estudio y conservación de los recursos naturales

## **2. Moleq̃a Nanotecnología**

- 2.1. Uso de nanopartículas de gliadina como terapia frente a enfermedades varias
- 2.2. Un enfoque general de las nanovacunas

## **3. Moleq̃a Farmacia**

- 3.1. ¿Inmunosupresores para la enfermedad de Crohn?
- 3.2. Medicamentos biológicos: biosimilares
- 3.3. La enfermedad de Gaucher: características clínicas y tratamientos

## **4. Moleq̃a Informática**

- 4.1. IA aplicada al entrenamiento de jugadores de eSports

## **5. Moleq̃a Forense**

- 5.1. Goma II y su uso por el grupo terrorista ETA
- 5.2. DMT: el psicotrópico natural

## **6. Moleq̃a Energía**

- 6.1. Obtención de electricidad a partir de plantas. La energía ¿fitovoltáica?

## **7. Moleq̃a Patrimonio**

- 7.1. Aplicación de radiografía en el Patrimonio Histórico

# Epigenetics: the new key to neurodegenerative disorders

Marieta Gómez Matos, Flavia Migliaccio & Valentín Ángel Limón Sarabia

**Abstract**— The interest towards the discovery of a suitable treatment for the increasingly frequent neurodegenerative diseases has led to the finding that epigenetics is at their basis. In this review, an insight on the main epigenetic events that normally take place inside the cells is provided, and the causal relationship between aberrant epigenetic regulation and neurodegenerative diseases is explained. The potential of some natural substances in counteracting these disorders has recently been uncovered, as they seem to intervene in epigenetics regulation so as to restore a healthy gene expression. These findings set the basis for the treatment of such diseases in a completely innovative way.

**Key Words**— Epigenetics, natural, neurodegenerative, regulation, treatment.

## 1. INTRODUCTION

### 1.1. What is epigenetics?

The DNA is not just a set of nucleotides that can only change if there is a modification in the sequence. DNA modifications that do not affect the sequence but can change the gene activity are the so-called epigenetic modifications. They regulate neurophysiological mechanisms such as learning, memory acquisition, or motor coordination, but also growth, differentiation and disease development. These changes are sometimes inheritable and transmitted by cell division. Moreover, the environment can influence the emergence of epigenetic modifications, through the exposure to pollutants or the diet [1].

The usual epigenetic events are DNA methylation, histone modifications, chromatin remodeling, recognition of epigenetic modifications and action of non-coding RNAs [2], [3].

### 1.2. How can it influence our lives?

Epigenetic changes are responsible for regulating gene expression in cells, turning on or off genes to produce proteins only when they are needed. Errors in this process can lead to problems in gene activity that can cause cancer, degenerative and metabolic disorders. The effects that epigenetics can produce in our genome and on our health make its study even more necessary [1].

### 1.3. Neurodegenerative diseases associated to epigenetics.

Aberrant epigenetic marks have been found in many mental disorders such as aggressiveness, Alzheimer Disease (AD) and Parkinson Disease (PD). Both pathologies are influenced by a combination of genomic, epigenomic, metabolic, and environmental factors [2].

Non-successful treatments are the result of a limited knowledge of the pathogenic genomic variants in these diseases. There have been characterized 600 single-nucleotide polymorphisms, and mitochondrial and mendelian mutations in genes associated with AD. On the

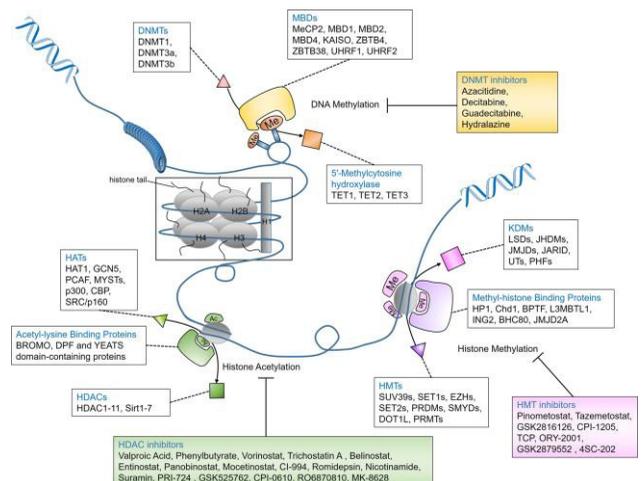
other hand, there are over 100 pathogenic genes involved in PD [2].

The study of these disorders concludes that the use of epidrugs might be the solution of this type of multifactorial diseases. In addition, the available treatments for these diseases have low efficiency (palliating symptoms but not stopping the development of the disease) and lots of side-effects [2].

Many of these epigenetic alterations appear in an asymptomatic stage, when they are still reversible, thus this could be the appropriate moment to treat them. However, the efficacy and safety in clinical trials of epidrugs has to be improved at some point, such as in drug delivery, in the values of inhibition (IC50), target specificity and treatment personalization [2].

## 2. MAIN EPIGENETIC MODIFICATIONS

Figure 1 shows some of the epigenetic marks that are going to be described in this section and some of their corresponding regulators.



**Figure 1.** Main epigenetic modifications and their related modulators [3].

## 2.1. DNA methylation.

The process of DNA methylation consists in the covalent addition of methyl groups to the DNA. It commonly takes place at the 5th position of the carbon ring of cytosine (C), especially when this nucleotide is followed by a guanine (G), thus forming the so-called CpG islands. These sites are found throughout ~60% of human promoters [3]. When promoters are hypermethylated, either transcription repressors are bound to them or transcription factors are inhibited, therefore this activity, combined with hypoacetylated and hypermethylated histones, results in a reduced gene expression [2]. Moreover, methyl-DNA is relatively inactive due to the compact organization of chromatin [3].

DNA methylation is fulfilled by DNA methyltransferase (DNMT) family, which transfers a methyl group from S-adenosyl-L-methionine (SAM) to cytosine [3].

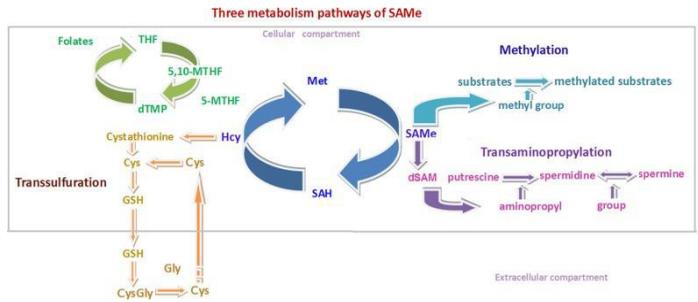
The principal example of such event is the alteration of the Vitamin B- and SAMe (S-adenosylmethionine)-mediated methylation system, in which an hypomethylated state is associated to elevated homocysteine (Hcy) levels. Therefore, Hcy concentration is a marker of risk for neurodegenerative diseases development [2].

Folic acid, also known as vitamin B9, donates a methyl group to Hcy through its derivatives (green arrows, Figure 2), finally turning Hcy into SAMe. SAMe is responsible for methylation of the main macromolecules (light blue arrows, Figure 2), and, consequently, also for DNA. After the methyl group loss, SAMe turns ultimately again into Hcy (dark blue cycle, Figure 2). According to this and knowing that Vitamin B (Vit B) complex is directly related to promoting all this response, we can easily infer that high Vit B levels provokes a decrease of free Hcy. In other words, Vit B restores DNA methylation [2].

Consequently, Vit B complex (composed by B2, B6, B12 and folic acid) is in clinical trials in some countries for its potential benefits in prevention of neurodegenerative diseases and it is being prescribed as dietary supplement for patients having high levels of Hcy [2].

On the other hand, hypermethylation of pathogenic genes can also cause diseases. For that, DNA methyltransferase inhibitors are required. Two examples of natural compounds that help regulating this alteration are green tea, whose main polyphenol, called EGCG also known as catechin, has notable effects on AD; and curcumin, one characteristic compound of turmeric, and its derivatives. Hence, dietary supplementation with specific nutrients containing such active agents could help treating neurodegenerative diseases [2], [5], [6].

Aging seems to be associated with normal changes in DNA methylation and demethylation; however, altered methylation of DNA can result in multiple diseases [3].



**Figure 2.** SAMe-metabolism. As we can see in the scheme, vitamin B9 (folate) is directly responsible of the methylation state of Hcy to ultimately produce SAMe (green and dark blue cycles), which is the methyl donor of the main biomolecules, including DNA (light blue pathway) [11].

## 2.2. Histone Post-Translational Modifications Affecting Chromatin Remodeling.

Histone post-translational modifications change the chromatin structure into a tight (heterochromatin) or loose (euchromatin) conformation, thus modifying gene accessibility to the transcription processes [2].

Histone acetylation reduces the electrostatic interactions which result in more flexible chromatin conformation that allows gene accessibility, thus starting the transcription. It is important to specify that histone deacetylases (HDAC) are capable to lower the level of acetyl groups, improving the electrostatic binding of histones to DNA and promoting a compact chromatin conformation with the subsequent gene transcription repression. This conformation compromises the DNA repair machinery and the access of transcription factors, which in turn affect synapses and lead to memory problems [2].

## 2.3. Epigenetic Regulation of Non-Coding RNAs Expression.

Non-coding RNAs (ncRNAs) modulate gene expression post-transcriptionally. For example, microRNAs (miRNAs) induce mRNA degradation by binding to their 3' untranslated region; their altered expression affects modulation of direct pathogenic genes or those involved in other neurophysiological roles indirectly associated with the disease. Therefore, miRNAs are the most popular biomarkers for disease diagnosis and progression [2].

## 2.4. Epigenetic Regulation of Telomeres.

Telomeres contain a lot of TTAGGG repeats and are placed at the end of the chromosomes, protecting them from degradation. The protective ability of these structures lies in the length, but they will shorten by aging and this can be enhanced by neurodegenerative disorders [2].

Telomere shortening can happen by epigenetic alterations such as: decrease in histone trimethylation of H3K9 and H4K20; decrease in histone dimethylation of H3K79; decrease in H3 and H4 acetylation at telomeric and sub-telomeric regions; and aberrant DNA methylation. How-

ever, histone hypoacetylation grants the heterochromatin a protective state that prevents the activation of DNA damage pathways [2].

### **3. EPIGENETIC KEYS TO NEURODEGENERATIVE DISORDERS: SCIENTIFIC EXPLANATION AND NATURAL APPROACH.**

#### **3.1. DNA Methylation.**

Reduced DNA methylation has been detected in both AD and PD [2].

In AD the hypomethylation and the consequent  $\beta$ -secretase 1 (BACE1) overexpression impairs APP (Amyloid Precursor Protein) cleavage, thus promoting A $\beta$  aggregation into senile plates [2].

A distinctive indicator of AD-related diseases is protein tau hyperphosphorylation; it is caused by Vit B deficiency which leads to kinase 3b hyperexpression [2]. Since hyperphosphorylated protein tau is insoluble, it leads to aggregates formation [12].

In PD, reduced SAMA activity may alter DNA methylation as shown in Figure 2; this leads to the aberrant expression and aggregation of  $\alpha$ -synuclein, a protein whose accumulation leads to reactive oxygen species and cell death in neurons [2].

#### **3.2. Histone post-translational modifications affecting chromatin remodeling.**

##### **3.2.1. Histone Acetylation Modulators.**

Histone acetylation, that induces chromatin decompaction and inhibits histone methylation, can be promoted by Histone Acetyltransferase (HAT) activating compounds. However, such compounds usually have poor solubility and membrane permeability, so they are not commonly used [2].

Nevertheless, there are some examples of successful compounds in this regard. The first one is the synthesis of a chemical compound called CTPB, which is target-specific and is capable of crossing the blood brain barrier. The second is the already mentioned compound curcumin, which also acts as HAT inhibitor; besides, it is also permeable to cell membranes and has a specific inhibitory function, as well as a protective function for neurons from oxidative damage [2].

##### **3.2.2. Histone Deacetylase Modulators.**

They can be distributed in three groups:

###### **a. Class I, II and IV HDAC Inhibitors.**

Class I, II and IV HDACi can potentially restore global histone deacetylation, that is a common feature of most neurodegenerative processes. The major part of HDACi under development provides improvements in model animals with AD and PD. Some examples are benzamides, ketones and cyclic peptides, some of them approved for

cancer treatment. Moreover, other compounds included in the short chain fatty-acid family—such as sodium butyrate and propionate—are found in the gastrointestinal tract due to microbial fermentation of dietary fibers, and act by inhibiting classes I, II and IV HDAC [2].

###### **b. Class III HDAC (SIRT) Inhibitors.**

Some of class III HDAC modulators, which have shown benefits for several types of cancer, promise treatments for neurodegenerative diseases. They are the ones that do not induce cell death pathways. Sirtuin inhibitors, specially SIRT2 inhibitor, show a rescue in  $\alpha$ -synuclein-mediated toxicity, which blocks the progression of PD in animal models which are affected by the disease [2].

A competitive SIRT inhibitor is nicotinamide, which improves microtubules stability by reducing phosphorylated tau (in Thr231), thus restoring cognitive deficits in AD mice [2].

A natural HDACi that is being studied for cancer treatment is sulforaphane, a sulfur-containing compound present in vegetables of the family Cruciferae or Brassicaceae such as broccoli, cabbage or cauliflower [5], [8].

Therefore, its intake can potentially have a positive effect in treatment of neurodegenerative diseases [2].

###### **c. Class III HDAC (SIRT) Activators.**

Neurodegeneration has common hallmarks such as DNA damage and impaired DNA repair mechanisms due to stress signaling pathways. This is fought by sirtuins, that act in response to counteract these signals [2].

Red grapes bring us a neuroprotective compound called resveratrol. It has important antioxidant and anti-inflammatory roles, resulting in the inhibition of A $\beta$  aggregation and A $\beta$ -induced apoptosis. Resveratrol and resveratrol structural derivatives, such as fisetin found in strawberry, onions and cucumber, are SIRT1 deacetylase activators that significantly extended the lifespan of some model organisms [2], [5], [7].

##### **3.2.3. Modulators of Histone Methylation.**

As previously explained, methyl groups removal or addition either directly on DNA or on histone tails are key epigenetic modifications that can be targeted by epigenetic drugs. Therefore, histone methyltransferases and demethylases can be inhibited to compensate a change in gene expression caused by an aberrant epigenetic modification. The inhibition of the former induces histone acetylation—because histone methylation and acetylation tend to be opposite epigenetic marks and the inhibition of one, induces the activation of the other—and, consequently, gene expression, which can be very useful in this kind of therapies. However, these compounds are very often toxic and have lots of non-specific targets, so they are not commonly used. Regarding histone demethylases, the enzyme Lysine-specific demethylase 1 (LSD1 or KDM1)

deserves special mention, since it is responsible for demethylating mono- and dimethylated H3K4 and H3K9 [9].

LSD1 is being employed as target for therapeutic treatments by the Spanish biotech company Oryzon.

In terms of aggressiveness-related disorders, the small, brain-penetrant molecule called Vafidemstat is remarkable. It is used to inhibit histone demethylase LSD1 in different types of pathological groups of patients such as aggressive, or with psychiatric and behavioural features, adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), Autism Spectrum Disorder (ASD) and Borderline Personality Disorder (BPD). This drug is safe and well tolerated and produces significant improvements in agitation and aggression levels [10].

### 3.3. Non-coding RNAs.

RNA interference can be employed to downregulate pathogenic genes expression, so that it represents a promising therapeutic strategy to treat neurodegenerative diseases. Since gene targets are abundant, the study has to be focused on the ones that can be specifically related to neurodegenerative diseases, so as to obtain a potential treatment. Besides, some miRNA-based approaches target the components of the epigenetic machinery and exert direct control in DNA methylation and chromatin remodeling processes [2].

Some natural examples for miRNA modulation are EGCG and curcumin [2], [5], [6].

### 4. CONCLUSIONS: PURPOSES FOR THE FUTURE.

Epigenetic regulators have already demonstrated a great potential for approaching different epigenetic-based disorders, such as neurodegenerative diseases as well as other mental disorders, cancer and even aging. Therefore, their current study is being boosted and the future of epidrugs seems promising. Nevertheless, the contradictory nature of the aberrant epigenetic modifications makes it difficult to find a universal treatment for a single disease, given that it can be due to different alterations. This underlines the need for personalized and target-specific treatments. Other goals that have to be achieved are enhanced efficacy and safety in drug delivery.

Although there is still much progress to be made in this field, in the meantime benefits can be provided by implementing natural compounds, some of them shown in Table 1, in our diet.

Food	Compound	Effect(s) on epigenetic modification(s)
Turmeric	Curcumin	- DNA methylation inhibition - Histone acetylation and deacetylation inhibition - miRNA modulation
Green tea	EGCG	- DNA methylation inhibition - Histone acetylation - miRNA modulation
Legume, sardine, egg, salmon, dry fruits, mushrooms, vegetables, meat	Vit B complex	- DNA methylation activation - Histone deacetylation inhibition (class III)
Broccoli, cabbage, cauliflower	Sulforaphane	- DNA methylation inhibition - Histone deacetylation inhibition
Red grapes, strawberry, onion, cucumber, citrus	Resveratrol Fisetin	- DNA methylation inhibition - Histone deacetylation inhibition

**Table 1.** Epigenetic modulators; the natural approach [2], [5], [6], [7], [8].

### REFERENCES.

- [1] "What is epigenetics? - Genetics Home Reference - NIH." [Online]. Available: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/epigenome>. [Accessed: 25-Apr-2020].
- [2] O. Tejjido and R. Cacabelos, "Pharmacoeconomic interventions as novel potential treatments for Alzheimer's and Parkinson's diseases," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 10. MDPI AG, 16-Oct-2018, doi: 10.3390/ijms19103199.
- [3] Y. Cheng et al., "Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: Mechanisms and advances in clinical trials," *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–39, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41392-019-0095-0.
- [4] "Epigenetics Modifications - DNA methylation | Proteintech Group." [Online]. Available: <https://www.ptglab.com/news/blog/epigenetics-modifications-dna-methylation/>. [Accessed: 30-Apr-2020].
- [5] K. R. Landis-Piwowar and N. R. Iyer, "Cancer Chemoprevention: Current State of the Art," *Cancer*

Growth Metastasis, vol. 7, p. CGM.S11288, Jan. 2014, doi: 10.4137/cgm.s11288.

[6] "(-)-Catechin (18829-70-4) | Cayman Chemical." [Online]. Available:

<https://www.caymanchem.com/product/18644/%28-%29-catechin>. [Accessed: 29-Apr-2020].

[7] E. Ratovitski, "Anticancer Natural Compounds as Epigenetic Modulators of Gene Expression," *Curr. Genomics*, vol. 18, no. 2, pp. 175–205, Feb. 2017, doi: 10.2174/1389202917666160803165229.

[8] E. Juengel, H. H. H. Erb, A. Haferkamp, J. Rutz, F. K. H. Chun, and R. A. Blaheta, "Relevance of the natural HDAC inhibitor sulforaphane as a chemopreventive agent in urologic tumors," *Cancer Lett.*, vol. 435, pp. 121–126, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.canlet.2018.07.017.

[9] A. Maiques-Diaz and T. C. P. Somerville, "LSD1: Biologic roles and therapeutic targeting," *Epigenomics*, vol. 8, no. 8. Future Medicine Ltd., pp. 1103–1116, 01-Aug-2016, doi: 10.2217/epi-2016-0009.

[10] M. Ropacki et al., "Vafidemstat improves aggression scores in Autism: REIMAGINE, third cohort clinical data," 2019.

[11] J. Gao et al., "S-Adenosyl Methionine and Transmethylation Pathways in Neuropsychiatric Diseases Throughout Life," *Neurotherapeutics*, vol. 15, no. 1, pp. 156–175, Jan. 2018, doi: 10.1007/s13311-017-0593-0.

[12] C. Boon Wong, Y. Kobayashi, and J. Xiao, "Probiotics for Preventing Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease," in *Gut Microbiota - Brain Axis*, IntechOpen, 2018.



**Flavia Migliaccio** is graduated in Biology in Università Federico II in Napoli. She has been an incoming student at Universidad Pablo de Olavide, Seville. She is currently attending a MSc in Molecular Biology.



**Marieta Gómez Matos** is studying Biotechnology in Universidad Pablo de Olavide, Seville. She is currently an internal student in Microbiology Area.



**Valentín Ángel Limón Sarabia** got the certificate of Clinical and Biomedical Laboratory Technician by IES Alixar in 2017. Currently, he is studying Biotechnology in Universidad Pablo de Olavide, Seville.

# Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental al estudio y conservación de los recursos naturales

Amador Huerta Vela y Alejandro Centeno-Cuadros.

**Resumen**— El ADN ambiental (*environmental DNA*, eDNA) es una metodología para analizar el material genético liberado por individuos que han transitado o habitan en el medio muestreado con el objetivo de identificar las especies a las que pertenece dicho material. El tipo de muestreo es no invasivo y permite analizar varios taxones simultáneamente partiendo de una misma muestra. Esta técnica, por lo general, identifica un mayor número de taxones y con menores tasas de error que las técnicas no moleculares. Desde la aparición de los secuenciadores masivos, el número de estudios relacionados con el eDNA ha aumentado exponencialmente debido a la relativa facilidad y abaratamiento de los costes asociados a la secuenciación. Las aplicaciones del eDNA siguen en aumento y diversificándose a través de diversas áreas de conocimiento asociadas a las Ciencias de la Vida. Este trabajo cuantifica y describe la influencia que ha tenido el eDNA en el estudio y conservación de la biodiversidad, prestando especial interés al estudio de ecosistemas antiguos, las interacciones planta-polinizador, el análisis de las dietas, la detección de especies invasoras, las respuestas a la contaminación o el análisis de la calidad del aire.

**Palabras Claves**— Muestreos no invasivos, *New Generation Sequencing*, Secuenciación Masiva, *barcoding*, *metabarcoding*.



## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano ha tratado siempre de entender el movimiento de los organismos en la naturaleza para poder antecederse a ellos y mejorar la gestión de los recursos naturales. Hoy día, además, dicha gestión debe de ir estrechamente ligada a la conservación de la biodiversidad. El estudio de la biodiversidad y el movimiento de los organismos se han realizado tradicionalmente mediante muestreos en el campo. En ellos se captura y marca a los individuos para posteriormente liberarles, con el objetivo de recapturarles e identificarles en base a su marcaje. Esta metodología ha contribuido notablemente a la Ecología del Movimiento [1], pues la comparación entre las localidades de captura y posteriores recapturas identifica los movimientos de los individuos. Sin embargo, las tasas de captura y proporción de individuos capturados en relación al total de la población utilizando este tipo de muestreos no siempre es suficiente para realizar estudios demográficos, especialmente en especies esquivas [2] o por problemas metodológicos [3]. El radiomarcaje, es decir, el seguimiento de los individuos mediante sistemas de posicionamiento global (GPS) describe con detalle los movimientos de los individuos, pero puede amenazar la supervivencia de las especies por la propia captura y manejo de los individuos (e.g. [4]).

La aplicación de las técnicas genéticas al estudio de la biodiversidad ha contribuido enormemente al estudio de la fauna y flora silvestres. La caracterización y cuantificación de la biodiversidad vivió un fuerte impulso desde la creación del proyecto *Barcoding of life* [5] y *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL). Este proyecto plan-

tea como objetivo identificar toda la biodiversidad mediante el uso de pequeñas secuencias de ADN estandarizadas, utilizando el CBOL como red logística. Desde entonces se han unido más de 200 organizaciones de 50 países diferentes al CBOL e impulsó *The Barcode of Life Data System* (BOLD) para ayudar a la adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de todos los datos moleculares enmarcados dentro del CBOL (los llamados “códigos de barras”) [6].

Gracias a los proyectos CBOL y BOLD existe hoy día información molecular disponible para identificar a cientos de miles de taxones, aunque aún queda mucho camino por recorrer. Una de las mayores dificultades a las que se enfrentaron en este proyecto era la puesta a punto de una metodología que permitiese identificar cualquier traza de material genético que se encontrara en una muestra de tierra, agua o aire. Hoy día, existe un conjunto de técnicas de muestreo genético que permiten identificar a los organismos que estén o hayan estado en contacto con la muestra a analizar. Tal ha sido su auge e impacto que se acuñó el término “ADN ambiental” (*environmental DNA* o eDNA) para definirlos y hasta existe ya una revista especializada en este tipo de metodologías (*Environmental DNA*, editorial Wiley). Las técnicas de eDNA dirigidas a cumplir los objetivos de CBOL permiten identificar y monitorizar la biodiversidad presente en una muestra cogida en el medio ambiente, permitiendo ahora con mayor probabilidad y eficiencia trabajar con especies poco abundantes, esquivas y/o en peligro de extinción [7]. Debido a su relevancia y aplicabilidad, así como al amplio abanico de áreas de conocimiento donde se utiliza el eDNA, este trabajo se centra en resumir las metodologías, aplicaciones y perspectivas de futuro del eDNA prestando especial atención a aquellas relacionadas con el

estudio y conservación de los recursos naturales para finalmente cuantificar mediante análisis bibliométricos los trabajos que se han publicado hasta la fecha que hayan basado sus resultados en eDNA.

## 2. TÉCNICA Y ASPECTOS METODOLÓGICOS

El ADN ambiental es una técnica para la obtención de material genético proveniente del medio (ya sea suelo, agua o aire) para el estudio de las especies o poblaciones que habitan o han habitado en él [8], [9]. El término comenzó a utilizarse a principios de siglo a raíz de unas publicaciones en el área de Microbiología centradas en genómica de microorganismos no cultivados [10] y en la clonación del metagenoma del suelo [11]. Desde entonces el número de trabajos publicados que utilizan esta técnica ha aumentado exponencialmente (ver "Bibliometría") y siguen surgiendo nuevas aplicaciones.

Las técnicas de eDNA se encuentran estrechamente relacionadas con las metodologías para la identificación de especies mediante marcadores moleculares. Estas últimas pueden clasificarse en función de si se identifica una o varias especies simultáneamente (*barcoding* y *metabarcoding*, respectivamente) y el marcador molecular a utilizar dependerá del nivel taxonómico al que se quiera llegar en la identificación (Figura 1). Por tanto, el término *eDNA metabarcoding* se utiliza para el conjunto de técnicas moleculares que se utilizan para analizar muestras medioambientales en las cuales se tiende a identificar varios especímenes simultáneamente, pero cuya identificación suele llegar hasta niveles taxonómicos de género. Para tal fin se utilizan marcadores específicos (marcadores diseñados para un sistema de estudio determinado) ya que los considerados como genéricos (generalmente analizados y propuestos por el CBOL) suelen tener menor éxito de amplificación y, por tanto, plantean problemas técnicos en la secuenciación del material genético [8].

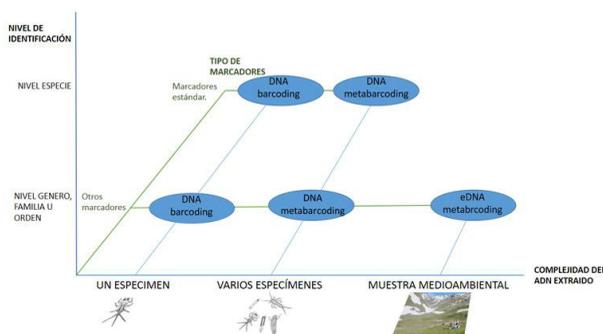


Figura 1. Terminología sugerida para la identificación taxonómica en función de los marcadores moleculares utilizados, el nivel de identificación y la complejidad del ADN extraído. Figura adaptada de [8].

La probabilidad de éxito del eDNA (entendida como la identificación de los especímenes presentes en la muestra original) aumentará siempre que se minimice la degradación del ADN desde la recolección de las muestras hasta el análisis de las mismas en el laboratorio. A continuación, se describen los aspectos clave en la conservación del ADN.

## 2.1. Muestreo

Una de las principales ventajas del eDNA es que las muestras se obtienen directamente del medio, sin necesidad de observarse a primera vista material biológico. Pueden recolectarse del suelo, agua o aire debido a la premisa de que todos los organismos se desprenden en algún momento de material genético a través de células epiteliales, excreciones, pelo, etc (Figura 2). Por ejemplo, se puede obtener el ADN localizado en muestras de suelo o agua siempre y cuando contengan restos biológicos tales como orina [12], heces [13], piel o cabello [14], hojarasca o los exudados de las raíces [15]. El eDNA forma parte de los denominados muestreos no invasivos, que son aquellos en los que no se interacciona directamente con la especie a analizar para recolectar la muestra [16]. La principal diferencia entre el eDNA con los muestreos no invasivos convencionales es que en el eDNA existe la incertidumbre sobre si existe material genético o no en la muestra recogida mientras que en el resto de muestreos no invasivos siempre se espera recoger algo de material genético aunque sea en concentraciones mínimas o degradado.

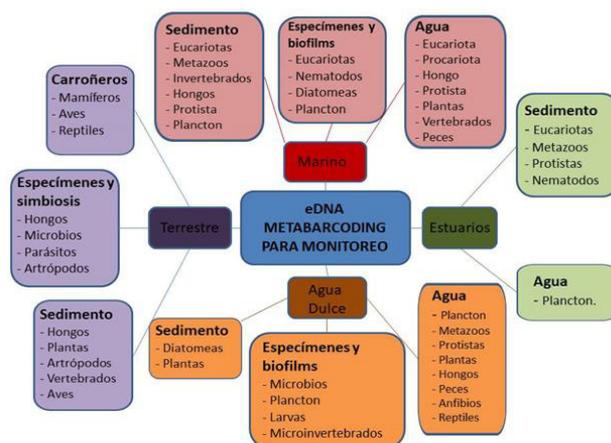


Figura 2. Monitorización de la biodiversidad a través de eDNA metabarcoding en diferentes sustratos. Las tonalidades rojas para ambientes marinos, las verdes para estuarios, las naranjas para sistemas de agua dulce y las moradas para terrestres. Figura modificada a partir de [9].

## 2.2. Conservación del material.

Existe una gran importancia en la conservación que haya tenido el material biológico (y, por tanto, el material genético) desde su liberación en el medio hasta que se recoge la muestra. Todo material orgánico se degrada paulatinamente, pero dependiendo de las condiciones de almacenamiento esta degradación será mayor o menor. Los parámetros que mayor repercusión tienen en la conservación del ADN son el tiempo y la temperatura a la que se conserva el material.

### 2.2.1. Tiempo

Existen dos etapas clave para la conservación de las muestras. El tiempo que transcurre desde que se libera la

muestra al medio hasta que es recolectada (primera etapa) varía según las condiciones físico-químicas del medio. Así por ejemplo, en aguas templadas las muestras pueden conservar el ADN durante semanas, frente a los miles de años en permafrost seco y frío [17]. Por esta razón, la técnica se ha utilizado en varias ocasiones para analizar diferentes grupos taxonómicos de ADN antiguo, logrando obtener material genético [18]. La conservación y transporte de las muestras una vez colectadas (segunda etapa) cobran especial importancia para la aplicación de las técnicas de eDNA, ya que la cantidad y calidad del material genético en las muestras (dependiendo del sustrato) suele ser menor que el disponible en el material biológico colectado directamente de los individuos. Un método de conservación no apropiado para el tipo de muestra a analizar, por tanto, podría causar una pérdida importante del ADN molde para seguir adelante con el muestreo genético. Existen hoy día numerosas metodologías para tratar de maximizar el rendimiento y calidad del ADN extraído que se deberán escoger con cautela en función del sustrato donde se haya realizado el muestreo (e.g. filtrado de muestras de aguas y/o aire y conservación en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas). Las muestras obtenidas se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo a baja temperatura, obteniendo como resultado un banco de muestras al que acceder cuando se quiera para volver a analizarlo [19].

### 2.2.2. Temperatura

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, se puede recomendar la preparación para su almacenamiento en congeladores desde el momento en que las mismas sean colectadas. El protocolo de almacenamiento generalmente propuesto consiste en almacenar las muestras inmediatamente a 4°C y trasladarse a congeladores (-20°C) antes de haber pasado 48 horas (si se van a analizar a corto plazo) o a -80°C para ser analizado a largo plazo [19]. Se ha demostrado recientemente que las muestras de agua se podrían conservar a temperatura ambiente hasta 14 días antes de la degradación del ADN que impida su extracción y caracterización [20].

Existen dos protocolos para envíos que no tarden más de tres días de muestras que se vayan analizar en otro laboratorio. Por un lado, si las muestras se congelaron o liofilizaron se deben mantener en los congeladores a -20°C con el hielo seco que se utilizará para enviar hasta su destino. Por otro lado, las muestras conservadas en etanol al 75% se pueden mantener a temperatura ambiente [21]. Sin embargo, para determinados tipos de muestras (e.g. heces o determinados tipos de agua) [22] se recomienda no realizar la extracción de ADN nada más recolectarlas, sino almacenarlas por diferentes métodos de enfriamiento, secado [23] (pero ver Hartb, Bainarda, & Klironomosb (2010) como excepción para ADN fúngico), liofilización o adición de conservantes para posteriores análisis [19].

### 2.3. Análisis de las muestras

En función de la naturaleza de la muestra puede ser neces-

sario realizar un preprocesamiento antes de la extracción del ADN para mejorar la calidad de secuenciación [25]. Lear et al., (2018) recomiendan para estos preprocesamientos el uso de kits Qiagen DNeasy PowerSoil y PowerMax para la extracción de ADN de suelo, sedimento, heces y hojarascas, DNeasy PowerSoil para la extracción de ADN del tejido vegetal, DNeasy Blood y Tissue para la extracción en tejido animal en general y DNeasy PowerSoil para macroorganismos de agua y hielo.

Los estudios de eDNA pueden centrarse en una o varias especies (*Figura 1*), para lo cual se utilizan cebadores específicos o genéricos, respectivamente [17]. Los cebadores utilizados deben de tener una longitud en pares de bases lo suficientemente corta para poder unirse a fragmentos degradados de ADN que idealmente sean idénticas pero variables entre especies [26]. Para los trabajos de *eDNA metabarcoding*, por tanto, se recomienda i) multiplexar los cebadores (es decir, combinar varias parejas de cebadores en una misma reacción), ii) que los organismos que se intente identificar sean recíprocamente monofiléticos y, en la medida de lo posible, iii) que coincidan con las bases de datos existentes para los grupos taxonómicos que se quieran estudiar [27].

## 3. ADN AMBIENTAL EN LA ERA DE LA GENÓMICA

El avance de las tecnologías de secuenciación automática junto a la creciente necesidad de secuenciación masiva que minimice los tiempos y costes promovió el desarrollo de la denominada secuenciación masiva (*New Generation Sequencing*, NGS) [8]. Las técnicas NGS son un conjunto de técnicas de secuenciación genética de alto rendimiento que permiten secuenciar de forma rápida secuencias largas (Mb) del genoma y en paralelo (es decir, varias muestras simultáneamente). Con NGS se obtienen decenas de miles de pares de bases reduciendo a unas cuantas horas el tiempo que hasta hace pocos años requeriría meses de trabajo [28]. Por tanto, NGS ofrece un salto cualitativo y cuantitativo del rendimiento adquirido con las técnicas de secuenciación previas. Los secuenciadores NGS redujeron el tiempo empleado y aumentaron la longitud de los fragmentos secuenciados, todo ello a costes más reducidos (pasando de 10\$ por nucleótido en 1990 utilizando secuenciación automática de Sanger a 0,01\$ utilizando secuenciadores NGS en 2005), aumentando de este modo el rendimiento.

## 4. APLICACIONES DEL ADN AMBIENTAL

El número de estudios relacionados con el ADN ambiental creció de manera exponencial a partir de 2012, fundamentalmente por el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y la competencia en el mercado de las distintas plataformas de secuenciación. Una consecuencia directa fue el aumento exponencial (ver Bibliometría) del número de aplicaciones de esta técnica a diversas disciplinas dentro de las Ciencias de la Vida. Todas tienen en común la misma finalidad (identificar especies o conocer sus hábitos -e.g. dieta-) y las difiere el contexto y apli-

cación de la metodología. Por ejemplo, una muestra de excremento se puede utilizar para identificar la dieta del animal que la defecó (análisis de dieta) o para identificar al propio animal que la defecó. En este último caso, la identificación taxonómica puede servir para contribuir a la conservación de unas especies [29], [30] o, por el contrario, para evitar en la medida de lo posible el establecimiento de otras no deseadas (e.g. especies invasoras). Con la información recogida se puede describir y analizar la distribución y diversidad de especies y comunidades [31] o identificar organismos que estén o hayan estado de tránsito y que pasen desapercibidos con las técnicas de muestreo tradicionales [19]. A continuación, se detallan algunas de las principales aplicaciones del eDNA transversales a las diferentes áreas dentro de las Ciencias de la Vida.

#### 4.1. Ecosistemas antiguos

Conocer cómo fueron los ecosistemas en tiempos pasados y compararlos con los actuales resulta de utilidad para la gestión y conservación de la biodiversidad. Estas aplicaciones cobran especial interés en el marco de un mundo afectado por el cambio global y la amenaza de introducción de especies invasoras [9]. Por ejemplo, se pudo reconstruir la historia florística local en torno a un lago analizando el ADN sedimentario [32]. Francesco Ficetola y compañeros estudiaron [33] el impacto de una especie invasora animal (el conejo europeo) sobre las comunidades de plantas en las Islas Kerguelen (un remoto archipiélago subantártico). En este estudio, los autores monitorizaron el deterioro de las comunidades vegetales desde el momento en que trazas del ADN de una especie de conejo invasor comenzó a detectarse mediante muestreos y técnicas de eDNA. El eDNA también es útil para el análisis de la evolución en el tiempo de la dinámica ecológica en poblaciones, comunidades o ecosistemas [34].

En general, se recomienda la combinación de técnicas de *metabarcoding* junto a las de eDNA para minimizar errores asociados a ambas metodologías en el estudio y reconstrucciones de ecosistemas antiguos [35], [36], puesto que el tiempo y las diferencias climáticas provocan un aumento en la degradación del ADN.

#### 4.2. Interacción planta-polinizador

Las especies polinizadoras son esenciales para la continuidad de la vida humana y su diversidad se está viendo reducida notablemente en las últimas décadas [9]. La aplicación de eDNA al estudio de las interacciones planta-polinizador ha contribuido a la conservación de ambos mutualistas, siendo el estudio del polen transportado por los polinizadores mediante eDNA la mayor contribución a esta aplicación. Las metodologías anteriores requieren de grandes inversiones de tiempo y esfuerzo debido a que se basaban en observaciones directas en el campo, además de requerir una gran formación y experiencia en identificación taxonómica de plantas a través del polen recolectado [9].

Un estudio comparativo entre los métodos tradicionales y

el *metabarcoding* concluyó que la aplicación del eDNA para los taxones más abundantes no suponía una gran ventaja, puesto que la coincidencia en los resultados entre ambos métodos era del 92% [37]. La verdadera contribución del eDNA se observó al considerar los taxones con menor representación relativa, puesto que la coincidencia entre ambos métodos se redujo por debajo del 50%, encontrando especies en un método que el otro omitía.

#### 4.3. Análisis de dieta

Las técnicas tradicionales para el análisis de la dieta se basan en la identificación de especies utilizando material alimenticio parcial o totalmente digerido. Estas metodologías son especialmente complicadas en el estudio de dieta de especies raras, acuáticas o nocturnas (entre otros) debido a la dificultad de encontrar muestras de estas especies. [38]. Asimismo, la degradación parcial o total de los restos biológicos digeridos causa que la identificación de los mismos requiera de especialistas y, en numerosas ocasiones, sea imposible. La aplicación del *metabarcoding* al análisis de dieta se ha postulado como una técnica más fiable debido a la resolución taxonómica que se consigue a partir del material biológico obtenido en los restos de dietas [39]. Esta afirmación es más relevante aún en el estudio de herbívoros y depredadores donde la adición de un cebador especial de bloqueo a la PCR reduce la amplificación de ADN no diana. [40][41]. El eDNA permite, además, identificar especies incluso sin necesidad de encontrar trazas de material genético de estas sino, por ejemplo, identificando parásitos de las especies depredadas en la muestra. [42]

El eDNA no solo se ha utilizado para la caracterización de la dieta sino también para estudios relacionados con la ecología de la alimentación y el control de la alimentación suplementaria [43]. Además, la aplicación de técnicas de eDNA han mostrado su eficacia en el análisis de la capacidad de carga de un ecosistema. Por ejemplo, utilizando técnicas de eDNA, se concluyó que el aumento en el número de individuos de una especie en un ecosistema determinado agotaba los recursos alimenticios y tenía consecuencias negativas para el equilibrio ecosistémico [42].

#### 4.4. Detección de especies invasoras

Las especies invasoras son aquellas que se encuentran fuera de su área de distribución natural y que pueden causar alteraciones en los ecosistemas. Se consideran, además, "exóticas" si han sido introducidas por el ser humano y suponen una de las mayores amenazas para los ecosistemas y biodiversidad [9]. Por ejemplo, las aguas de arrastre transportadas por grandes buques [44] fuerzan el movimiento de especies a regiones donde no se encontraban de forma natural, causando alteraciones de las interacciones ecológicas (especies acuáticas invasoras). Se realizó un muestreo en barco desde el Mar del Norte hasta los trópicos y analizaron las aguas de lastre en su viaje descubriendo que sí se transportaban especies que se consideran invasivas en sus áreas de introducción [45]. Ese

mismo año, se publicaron dos artículos donde se comparaban las técnicas tradicionales (monitoreo de rutina y análisis morfológicos visuales) con el *metabarcoding*, este último consiguió identificar un mayor número de especies [46], [47].

Uno de los mayores problemas para la erradicación de estas especies acuáticas invasoras es la dificultad para identificarlas en estados larvarios y juvenil, por lo que pasan desapercibidas en las primeras fases de invasión y dificultan enormemente su erradicación cuando existen adultos reproductores. [48]. El eDNA ofrece una detección temprana, permite identificar ADN aun estando en un porcentaje inferior al 0.5% del total de la muestra [48], tiene la capacidad de detectar taxones diferentes simultáneamente y se puede utilizar tanto en aguas dulces como en aguas saladas. Pese a esto, se recomienda precaución a la hora de interpretar los resultados y especialmente al cuantificar la biodiversidad utilizando información de presencia/ausencia de las especies [49] [48]. En la identificación de especies invasoras mediante eDNA son frecuentes los falsos positivos y negativos debido a la presencia de material genético de individuos muertos o errores en la resolución taxonómica (relacionados con la especificidad de los cebadores), entre otros [50]. Los errores en la identificación de especies pueden tener consecuencias negativas tanto en la inversión económica (dinero mal invertido) como en la gestión de los ecosistemas (falsos negativos de especies invasoras suelen finalizar con una invasión que se podría haber evitado) [51], [52].

#### 4.5. Respuesta a la contaminación.

El eDNA también puede aplicarse al estudio de las respuestas del medio ambiente ante los cambios provocados por la contaminación. Se usa, además, para averiguar las probabilidades de una especie de sobrevivir o no a un contaminante y así obtener información sobre la gravedad del mismo [9]. Un claro ejemplo del efecto de los contaminantes sobre los ecosistemas y la biodiversidad es el efecto de las prospecciones petroleras sobre los ecosistemas marinos. Gracias a los estudios que utilizan eDNA se concluyó que los metazoos son los más afectados por la contaminación derivada de la actividad petrolífera, hallándose cambios en las estructuras de las comunidades existentes en el sedimento que rodea la plataforma, que incluían metazoos así como algunos taxones protistas [53].

Se ha observado, además, que existen bacterias que pueden utilizarse como bioindicadores, al sobrevivir en áreas expuestas a los hidrocarburos (que explotan como recurso trófico). La identificación de estas bacterias mediante eDNA permite categorizar el grado de contaminación de un área determinada [54]. Del mismo modo estudiaron las comunidades fúngicas y bacterianas de suelo de la rizosferas de sauces (*Salix* spp.) y del suelo de una antigua planta petroquímica, obteniendo como resultado cambios drásticos en las comunidades fúngicas y una disminución de la diversidad bacteriana [55]. Los residuos nucleares también son susceptibles de ser identificados e incluso cuantificados mediante eDNA. Así por

ejemplo, utilizaron las comunidades microbianas para cuantificar el grado de contaminación por residuos nucleares, y concluyeron, que estas comunidades microbianas pueden ser usadas como marcadores ambientales para evaluar el impacto de los residuos nucleares [56].

Otro ejemplo de la aplicación del eDNA para la evaluación del impacto ambiental causado por las actividades humanas es su aplicación para el estudio de las zonas aledañas a las piscifactorías. Pawlowski y colaboradores demostraron que los foraminíferos son un sistema de estudio óptimo para determinar el impacto de la acuicultura y otras actividades en el medio marino [57]. Entre otras conclusiones de su trabajo, mostraron que la riqueza específica (i.e. el número de especies) disminuía cuanto más cerca de la piscifactoría se estimara dicho índice. Las comunidades bacterianas pueden ser también buenas indicadoras del impacto producido por las piscifactorías, debido a que la composición bacteriana está muy relacionada con el enriquecimiento orgánico de la zona [58].

Los metales pesados destacan entre los contaminantes más agresivos y con mayor impacto ambiental. La microbiota del suelo es fundamental para su productividad y los efectos de la contaminación son determinantes para la estructura de estas comunidades. Azarbad y compañeros [59] estudiaron los efectos del zinc y plomo sobre la microbiota en un suelo contaminado y concluyeron que estos metales pesados afectaban a la estructura, pero no a la variabilidad taxonómica o la composición de la comunidad. El mercurio es otro de los metales más contaminantes en los suelos. Sus efectos sobre la biodiversidad se han demostrado tanto en medios terrestres [60] como marinos [61], en estudios centrados en las comunidades de hongos y foraminíferos bentónicos (respectivamente).

#### 4.6. Análisis de la calidad del aire

La contribución del eDNA en el campo de la biomedicina ha sido especialmente notoria, puesto que las técnicas tradicionales son demasiado laboriosas y poco eficaces [62]. El análisis del aire se realiza tanto en ambientes naturales, como en ambientes cerrados (e.g. hospitales) [63] y suele centrarse en la caracterización del microbioma, comunidades fúngicas y/o polen en suspensión. El estudio del microbioma existente en el aire permite evaluar sus posibles efectos sobre la salud humana y el medio ambiente. Relacionado con el ámbito de la salud pública está el estudio de la diversidad taxonómica de las comunidades fúngicas en el aire por sus efectos tóxicos y/o alérgicos [64]. Los estudios anteriores al eDNA se centraban en las propiedades físicas y químicas y la mayoría de los datos existentes sobre las comunidades microbianas en el aire son a nivel familiar o de género y no dan información sobre sus potenciales alérgenos y patógenos. Por el contrario, con el eDNA sí se consigue identificar a nivel de especie. Al analizar el aire de Pekín durante un evento de smog fotoquímico se logró identificar la mayoría de los taxones llegando a nivel de especie y detectaron alérgenos y otros patógenos microbianos respiratorios [65].

El metabarcoding ha demostrado ser una herramienta

útil a la hora de identificar polen en el aire de muestras ambientales, por eso, Leontidou y colaboradores [66] propusieron un protocolo de preparación de muestras y extracción de ADN para el polen de muestreos de aire. Los autores concluyeron que el metabarcoding tiene una mayor resolución taxonómica incluso en muestras complejas.

#### 4.7. Inconvenientes comunes para las aplicaciones

Existen algunas conclusiones transversales a todas las aplicaciones anteriormente descritas. Por un lado, si bien se observa una mayor resolución taxonómica con respecto a las técnicas tradicionales [64], [67] se recomienda que se usen conjuntamente debido al sesgo en la identificación inherente a cada técnica [35] [68][69]. En general, este sesgo suele deberse a que el eDNA identifica peor las moléculas encontradas en menor proporción debido al sesgo en la amplificación y secuenciación de ADN, problema que se está logrando solventar [48]. A modo de resumen, se puede afirmar que las aplicaciones del eDNA suelen verse limitadas por la propia generación de las bibliotecas genéticas, las tasas de degradación del ADN dependiendo de la especie y el sustrato muestreado y la contaminación de las muestras [9], [32], [70], [71] (Ver “Técnica y aspectos metodológicos”).

### 5. BIBLIOMETRÍA

El análisis del impacto del eDNA en materias relacionadas con los recursos naturales se realizó mediante un análisis bibliométrico de publicaciones en la base de datos *Web Of Science* (WoS) ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)). Dado que el número de publicaciones anteriores al año 1980 suponen un escaso 1.1% y que estas publicaciones no tienen una relación real con la técnica, se restringió la búsqueda al periodo de tiempo comprendido desde 1980 hasta la actualidad. Con estas palabras clave se obtuvieron 2867 publicaciones sin filtrar por el área de conocimiento (Figura 3). La extensión y aplicación del eDNA en el dominio de Ciencia y Tecnología queda constatado al observarse un importante crecimiento exponencial a lo largo de esta última década, llegando a cuantificarse en un 308.9% el incremento del número de publicaciones en el periodo de 2014 a 2018.



Figura 3. Publicaciones basadas en eDNA por años

El eDNA se ha utilizado de manera similar en las seis

áreas de conocimiento estudiadas ( $1958.14 \pm 119.87$ ) (media  $\pm$  desviación estándar), si bien destacan levemente las áreas de Biología ( $n= 2174$ ) y Microbiología ( $n= 2070$ ). Se seleccionaron las áreas de Biogeografía y Biodiversidad, Biología, Botánica, Cambio Climático, Ecología, Microbiología y Zoología) ya que son disciplinas basadas en las ciencias experimentales y, como tal se basan en datos recogidos de muestreos (Figura 4). Dado que en todas ellas se han descrito sesgos debido a errores de muestreo, es lógico, que sean también aquellas disciplinas que más hayan tratado de adaptar el eDNA a sus intereses.

### 6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Dado que la obtención de genomas está siendo cada vez factible y económico, los trabajos ahora se dirigen a reducir las tasas de error de secuenciación, mejorar las técnicas bioinformáticas que permitan ensamblar las secuencias obtenidas y a las mejoras tecnológicas. Ya existen algunos de estos instrumentos como el “Biomeme two3” de la empresa “Biomeme, Inc.”, un dispositivo para PCR de mano con la capacidad de detectar hasta tres taxones diferentes [73] o secuenciadores masivos como los desarrollados por la empresa británica “Oxford Nanopore” que ya ha comercializado “MinION”, un secuenciador masivo del tamaño de una memoria USB.

La importancia de reducir el tamaño hasta poder utilizarlo como material portátil, que puedan detectar, amplificar e incluso secuenciar eDNA, resulta útil sobre todo en entornos remotos [74]. La reducción en el tamaño de los dispositivos permitiría realizar muestreos de eDNA de forma automática (como las boyas de muestreo de derrames de petróleo), combinando la tecnología para transmitir datos en vivo con el proyecto de mapeo en 3D de la superficie de la Tierra. Esto, llevado a gran escala, permitirá realizar muestreos remotos a lugares inaccesibles, como el Ártico o las profundidades de los océanos.

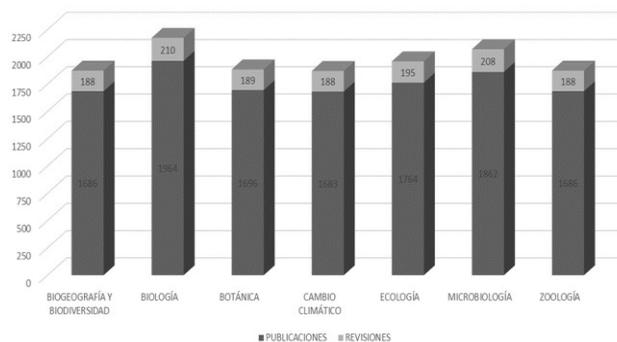


Figura 4. Número de publicaciones y revisiones por área de conocimiento indexadas en WoS desde 1980

### REFERENCIAS

- [1] R. Nathan *et al.*, “A movement ecology paradigm for unifying organismal movement research,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 49. pp. 19052–19059, 09-Dec-2008.
- [2] A. J. Piaggio *et al.*, “Detecting an elusive invasive species: a

- diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 14, no. 2, pp. 374–380, Mar. 2014.
- [3] C. P. Meyer and G. Paulay, "DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling," *PLoS Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 1–10, Nov. 2005.
- [4] J. Theuerkauf, S. Rouys, and C. Chatreau, "Mortality of radio-tracked wild rats in relation to transmitter weight and resilience of transmitters in relation to their design," *J. R. Soc. New Zeal.*, vol. 37, no. 3, pp. 85–90, 2007.
- [5] P. D. N. Hebert, A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. DeWaard, "Biological identifications through DNA barcodes," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 270, no. 1512, pp. 313–321, Feb. 2003.
- [6] S. Ratnasingham and P. D. N. Hebert, "BOLD: The Barcode of Life Data System: Barcoding," *Mol. Ecol. Notes*, vol. 7, no. 3, pp. 355–364, Jan. 2007.
- [7] K. Bohmann *et al.*, "Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 29, no. 6, pp. 358–367, 2014.
- [8] P. Taberlet, E. Coissac, M. Hajibabaei, and L. H. Rieseberg, "Environmental DNA," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1789–1793, Apr. 2012.
- [9] K. M. Ruppert, R. J. Kline, and M. S. Rahman, "Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA," *Global Ecology and Conservation*, vol. 17, Elsevier, p. e00547, 01-Jan-2019.
- [10] J. Handelsman, "Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68, no. 4, pp. 669–685, 2004.
- [11] M. R. Rondon *et al.*, "Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, no. 6, pp. 2541–2547, 2000.
- [12] N. Valiere and P. Taberlet, "Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification," *Mol. Ecol.*, vol. 9, no. 12, pp. 2150–2152, Dec. 2000.
- [13] N. Kurose, R. Masuda, and M. Tataru, "Fecal DNA Analysis for Identifying Species and Sex of Sympatric Carnivores: A Noninvasive Method for Conservation on the Tsushima Islands, Japan," *J. Hered.*, no. 6, pp. 688–697, 2005.
- [14] P. Henry and M. A. Russello, "Obtaining high-quality DNA from elusive small mammals using low-tech hair snares," *Eur. J. Wildl. Res.*, vol. 57, no. 3, pp. 429–435, Jun. 2011.
- [15] N. G. Yoccoz *et al.*, "DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 15, pp. 3647–3655, Aug. 2012.
- [16] P. Taberlet and G. Luikart, "Non-invasive genetic sampling and individual identification," in *Biological Journal of the Linnean Society*, 1999, vol. 68, no. 1–2, pp. 41–55.
- [17] P. F. Thomsen and E. Willerslev, "Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity," *Biological Conservation*, vol. 183, Elsevier, pp. 4–18, 01-Mar-2015.
- [18] P. F. Thomsen *et al.*, "Non-destructive sampling of ancient insect DNA," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, 2009.
- [19] G. Lear *et al.*, "Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples," *N. Z. J. Ecol.*, 2018.
- [20] B. J. Wegleitner, C. L. Jerde, A. Tucker, W. L. Chadderton, and A. R. Mahon, "Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples," *Conserv. Genet. Resour.*, vol. 7, no. 4, pp. 789–791, Dec. 2015.
- [21] D. Straube and A. Juen, "Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: A case study on earthworms," *Eur. J. Soil Biol.*, vol. 57, pp. 13–18, Jul. 2013.
- [22] J. Spens *et al.*, "Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter," *Methods Ecol. Evol.*, vol. 8, no. 5, pp. 635–645, 2017.
- [23] A. M. Nsubuga, M. M. Robbins, A. D. Roeder, P. A. Morin, C. Boesch, and L. Vigilant, "Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method," *Mol. Ecol.*, vol. 13, no. 7, pp. 2089–2094, May 2004.
- [24] M. M. Hartb, L. D. Bainarda, and J. N. Klironomosb, "Differential effect of sample preservation methods on plant and arbuscular mycorrhizal fungal DNA," *J. Microbiol. Methods*, vol. Volume 82, 2010.
- [25] C. Wittwer, C. Nowak, D. A. Strand, T. Vrålstad, M. Thines, and S. Stoll, "Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection," *Limnologica*, vol. 70, pp. 1–9, May 2018.
- [26] L. S. Epp *et al.*, "New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: Potential for studying past and present ecosystems," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1821–1833, Apr. 2012.
- [27] A. J. Drummond *et al.*, "Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment," *Gigascience*, vol. 4, no. 1, p. 46, Dec. 2015.
- [28] S. Shokralla, J. L. Spall, J. F. Gibson, and M. Hajibabaei, "Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research," *Molecular Ecology*, vol. 21, no. 8, pp. 1794–1805, 2012.
- [29] C. Qu and K. A. Stewart, "Evaluating monitoring options for conservation: comparing traditional and environmental DNA tools for a critically endangered mammal," *Sci. Nat.*, vol. 106, no. 3–4, p. 9, Apr. 2019.
- [30] J. Biggs *et al.*, "Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*)," 2015.
- [31] K. Bohmann *et al.*, "Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 29, no. 6, Elsevier Current Trends, pp. 358–367, 01-Jun-2014.
- [32] M. W. Pedersen *et al.*, "A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa," *Quat. Sci. Rev.*, vol. 75, pp. 161–168, Sep. 2013.
- [33] G. F. Ficetola *et al.*, "DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion," *Sci. Adv.*, vol. 4, no. 5, May 2018.
- [34] M. Bálint *et al.*, "Environmental DNA Time Series in Ecology," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 33, no. 12, Elsevier Ltd, pp. 945–957, 01-Dec-2018.
- [35] T. Jørgensen *et al.*, "Islands in the ice: Detecting past vegetation on Greenlandic nunataks using historical records and sedimentary ancient DNA Meta-barcoding," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1980–1988, Apr. 2012.
- [36] J. H. Sonstebo *et al.*, "Using next-generation sequencing for molecular reconstruction of past Arctic vegetation and climate," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 10, no. 6, pp. 1009–1018, Nov. 2010.
- [37] J. Hawkins *et al.*, "Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: A new tool for investigating honey bee foraging preferences," *PLoS One*, vol. 10, no. 8, Aug. 2015.
- [38] S. Boyer, S. D. Wratten, A. Holyoake, J. Abdelkrim, and R. H. Cruickshank, "Using Next-Generation Sequencing to Analyse the Diet of a Highly Endangered Land Snail (*Powelliphanta*

- augusta) Feeding on Endemic Earthworms," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013.
- [39] N. Guilleraut, S. Bouletreau, A. Iribar, A. Valentini, and F. Santoul, "Application of DNA metabarcoding on faeces to identify European catfish *Silurus glanis* diet," *J. Fish Biol.*, vol. 90, no. 5, pp. 2214–2219, May 2017.
- [40] H. Vestheim and S. N. Jarman, "Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples - A case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs," *Front. Zool.*, vol. 5, 2008.
- [41] J. C. McInnes, R. Alderman, B. E. Deagle, M. A. Lea, B. Raymond, and S. N. Jarman, "Optimised scat collection protocols for dietary DNA metabarcoding in vertebrates," *Methods Ecol. Evol.*, vol. 8, no. 2, pp. 192–202, Feb. 2017.
- [42] E. Jakubavičiute, U. Bergström, J. S. Eklöf, Q. Haenel, and S. J. Bourlat, "DNA metabarcoding reveals diverse diet of the three-spined stickleback in a coastal ecosystem," *PLoS One*, vol. 12, no. 10, Oct. 2017.
- [43] R. Kowalczyk *et al.*, "Influence of management practices on large herbivore diet-Case of European bison in Białowieza Primeval Forest (Poland)," *For. Ecol. Manage.*, vol. 261, no. 4, pp. 821–828, Feb. 2011.
- [44] W. A. Gerhard and C. K. Gunsch, "Metabarcoding and machine learning analysis of environmental DNA in ballast water arriving to hub ports," 2019.
- [45] A. Ardura, A. Zaiko, J. L. Martinez, A. Samuiloviene, Y. Borrell, and E. Garcia-Vazquez, "Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water," *J. Molluscan Stud.*, vol. 81, no. 4, pp. 495–501, 2015.
- [46] A. Zaiko, A. Samuiloviene, A. Ardura, and E. Garcia-Vazquez, "Metabarcoding approach for nonindigenous species surveillance in marine coastal waters," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 100, no. 1, pp. 53–59, Nov. 2015.
- [47] A. Zaiko, J. L. Martinez, J. Schmidt-Petersen, D. Ribicic, A. Samuiloviene, and E. Garcia-Vazquez, "Metabarcoding approach for the ballast water surveillance - An advantageous solution or an awkward challenge?," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 92, no. 1–2, pp. 25–34, Mar. 2015.
- [48] X. Pochon, N. J. Bott, K. F. Smith, and S. A. Wood, "Evaluating Detection Limits of Next-Generation Sequencing for the Surveillance and Monitoring of International Marine Pests," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, Sep. 2013.
- [49] C. Hatzenbuehler, J. R. Kelly, J. Martinson, S. Okum, and E. Pilgrim, "Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species," *Sci. Rep.*, vol. 7, Apr. 2017.
- [50] L. M. Fletcher *et al.*, "Bilge water as a vector for the spread of marine pests: a morphological, metabarcoding and experimental assessment," *Biol. Invasions*, vol. 19, no. 10, pp. 2851–2867, Oct. 2017.
- [51] J. A. Darling and A. R. Mahon, "From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments," *Environ. Res.*, vol. 111, no. 7, pp. 978–988, Oct. 2011.
- [52] G. F. Ficetola *et al.*, "Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 15, no. 3, pp. 543–556, May 2015.
- [53] A. Lanzén, K. Lekang, I. Jonassen, E. M. Thompson, and C. Troedsson, "High-throughput metabarcoding of eukaryotic diversity for environmental monitoring of offshore oil-drilling activities," *Mol. Ecol.*, vol. 25, no. 17, pp. 4392–4406, Sep. 2016.
- [54] O. Laroche, S. A. Wood, L. A. Tremblay, J. I. Ellis, G. Lear, and X. Pochon, "A cross-taxa study using environmental DNA/RNA metabarcoding to measure biological impacts of offshore oil and gas drilling and production operations," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 127, pp. 97–107, Feb. 2018.
- [55] T. H. Bell *et al.*, "Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny," *ISME J.*, vol. 8, no. 2, pp. 331–343, Feb. 2014.
- [56] M. B. Smith *et al.*, "Natural bacterial communities serve as quantitative geochemical biosensors," *MBio*, vol. 6, no. 3, pp. 1–13, May 2015.
- [57] J. Pawlowski, P. Esling, F. Lejzerowicz, T. Cedhagen, and T. A. Wilding, "Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: Assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 14, no. 6, pp. 1129–1140, Nov. 2014.
- [58] E. Dowle, X. Pochon, N. Keeley, and S. A. Wood, "Assessing the effects of salmon farming seabed enrichment using bacterial community diversity and high-throughput sequencing," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 91, no. 8, 2015.
- [59] H. Azarbad *et al.*, "Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 91, no. 1, 2015.
- [60] A. Durand, F. Maillard, J. Foulon, H. S. Gweon, B. Valot, and M. Chalot, "Environmental Metabarcoding Reveals Contrasting Belowground and Aboveground Fungal Communities from Poplar at a Hg Phytomanagement Site," *Microb. Ecol.*, vol. 74, no. 4, pp. 795–809, Nov. 2017.
- [61] F. Frontalini *et al.*, "Assessing the effect of mercury pollution on cultured benthic foraminifera community using morphological and eDNA metabarcoding approaches," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 129, no. 2, pp. 512–524, Apr. 2018.
- [62] K. Kraaijeveld *et al.*, "Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 15, no. 1, pp. 8–16, Jan. 2015.
- [63] X. Tong *et al.*, "High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis," *Sci. Rep.*, vol. 7, Jan. 2017.
- [64] E. Banchi *et al.*, "DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy," *PLoS One*, vol. 13, no. 3, Mar. 2018.
- [65] C. Cao *et al.*, "Inhalable microorganisms in Beijing's PM2.5 and PM10 pollutants during a severe smog event," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, no. 3, pp. 1499–1507, Feb. 2014.
- [66] K. Leontidou, C. Vernesi, J. De Groeve, F. Cristofolini, D. Vokou, and A. Cristofori, "DNA metabarcoding of airborne pollen: new protocols for improved taxonomic identification of environmental samples," *Aerobiologia (Bologna)*, vol. 34, no. 1, pp. 63–74, Mar. 2018.
- [67] S. Boessenkool *et al.*, "Use of ancient sedimentary DNA as a novel conservation tool for high-altitude tropical biodiversity," *Conserv. Biol.*, vol. 28, no. 2, pp. 446–455, 2014.
- [68] R. T. Richardson, C. Lin, J. O. Quijia, N. S. Riusech, K. Goodell, and R. M. Johnson, "Rank-based characterization of pollen assemblages collected by honey bees using a multi-locus metabarcoding approach," *Appl. Plant Sci.*, vol. 3, no. 11, p. 1500043, Nov. 2015.
- [69] R. T. Richardson, C.-H. Lin, D. B. Sponsler, J. O. Quijia, K. Goodell, and R. M. Johnson, "Application of ITS2 Metabarcoding to Determine the Provenance of Pollen Collected by Honey Bees in an Agroecosystem," *Appl. Plant Sci.*, vol. 3, no. 1, p. 1400066, Jan. 2015.
- [70] E. Bellemain *et al.*, "Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic

permafrost," *Environ. Microbiol.*, vol. 15, no. 4, pp. 1176–1189, Apr. 2013.

- [71] S. Boessenkool *et al.*, "Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1806–1815, Apr. 2012.
- [72] S. Boessenkool *et al.*, "Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA," *Mol. Ecol.*, vol. 21, no. 8, pp. 1806–1815, Apr. 2012.
- [73] A. A. Coble, C. A. Flinders, J. A. Homyack, B. E. Penaluna, R. C. Cronn, and K. Weitemier, "eDNA as a tool for identifying freshwater species in sustainable forestry: A critical review and potential future applications," *Sci. Total Environ.*, vol. 649, pp. 1157–1170, Feb. 2019.
- [74] J. A. Russell, B. Campos, J. Stone, E. M. Blosser, N. Burkett-Cadena, and J. L. Jacobs, "Unbiased Strain-Typing of Arbovirus Directly from Mosquitoes Using Nanopore Sequencing: A Field-forward Biosurveillance Protocol," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018.



**Amador Huerta Vela** obtuvo el título de de Técnico Superior de Laboratorio de Diagnóstico Clínico y se graduó en 2020 en Ciencias Ambientales por la Universidad de Cádiz. Este artículo es una adaptación de su trabajo de fin de grado.



**Alejandro Centeno-Cuadros** es Doctor en Biología y profesor en el Área de Genética de la Universidad de Cádiz. Sus intereses de investigación se centran en la aplicación de técnicas moleculares al estudio de los patrones de cambio evolutivo a nivel genómico y al estudio y conservación de la biodiversidad.

# Uso de nanopartículas de gliadina como terapia frente a enfermedades varias

Beatriz Pacheco-Sánchez, Miguel Salazar-Martínez

**Resumen**—Las nanopartículas han sido ampliamente estudiadas en aplicaciones farmacéuticas para facilitar la liberación de principios activos, dirigir fármacos a su diana terapéutica, permitir atravesar barreras fisiológicas tisulares y celulares, o proteger a agentes terapéuticos inestables frente a las condiciones de las distintas vías de administración, entre otras. Este artículo pretende dar a conocer el uso de las nanopartículas de gliadina como potencial herramienta en el transporte de medicamentos, gracias a su capacidad de adhesión a la mucosa gastrointestinal, justificada por su composición aminoacídica; siendo de gran utilidad en el tratamiento de enfermedades del tracto digestivo, no dejando de lado sus aplicaciones en la dirección de fármacos a tumores específicos, y la capacidad de la propia gliadina como moduladora del sistema inmune.

**Palabras Claves**—Nanopartículas, Gliadina, Bioadhesión, Enfermedades gastrointestinales, Oncología

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la administración de medicamentos por vía oral es la forma más aceptada tanto para los pacientes como para el personal sanitario. Sin embargo, la eficacia de multitud de fármacos presenta limitaciones cuando son administrados por esta vía. Dicha eficacia y/o disponibilidad oral puede estar condicionada por el tiempo de residencia de la forma farmacéutica en las diferentes regiones del tracto gastrointestinal, por una baja o parcial solubilidad del compuesto activo en los fluidos gastrointestinales (fármacos lipófilos), por una baja o restringida permeabilidad para atravesar la mucosa (fármacos de naturaleza hidrófila), y por la presencia de enzimas y de condiciones físico-químicas desfavorables que puedan inducir la degradación del fármaco [1].

Con el fin de aumentar el tiempo de residencia de un fármaco en contacto con su lugar de acción o absorción, el uso de sistemas de liberación de adhesivos es una buena estrategia [2]. Estos sistemas son capaces de aumentar el tiempo de contacto con la mucosa y permitir el establecimiento de un gradiente de concentración de fármaco entre la forma farmacéutica y el soporte biológico. El mencionado gradiente permite incrementar, de manera significativa, la cantidad de fármaco que es capaz de absorberse o de ejercer su acción en el lugar donde se encuentra inmovilizado el mismo [3]. El principal objetivo de las formas farmacéuticas adhesivas será, por tanto, aumentar la biodisponibilidad oral y la eficacia de los fármacos, siendo las nanopartículas una potencial herramienta a emplear para solventar los problemas derivados de la baja biodisponibilidad oral de numerosos fármacos.

Se han estudiado varios tipos de nanopartículas como portadoras de medicamentos para mejorar la administración de fármacos y su liberación controlada, siendo pro-

metedores los polímeros naturales al presentar menor toxicidad, y mayor seguridad y estabilidad. Dichas nanopartículas son administradas por vía oral en forma de suspensión con el objetivo de que difundan en el medio, pudiendo ser inmovilizadas en la superficie intestinal por un fenómeno conocido como bioadhesión. Además, su pequeño tamaño les permite penetrar a través de la capa de mucus y así alcanzar el epitelio de la mucosa [4]. En concreto, las nanopartículas de gliadina son interesantes por su elevada capacidad de mucoadhesión [1]. En este artículo se exponen algunas de las aplicaciones que ya están siendo investigadas para aprovechar tales propiedades en virtud de un beneficio médico.

## 2. NANOPARTÍCULAS DE GLIADINA

La gliadina (Fig. 1) es una glucoproteína natural, extraída del gluten de trigo (y de otros cereales del género *Triticum*), que tiene la capacidad de adherirse a la capa mucosa del estómago debido a su propiedad mucoadhesiva. Esta es resultado de varias interacciones como enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o penetración mecánica.

Esta proteína mucoadhesiva es polimórfica y puede ser clasificada, en función de su movilidad electroforética, en cuatro fracciones: alfa-, beta-, gamma-, y omega-gliadinas. A su vez, respecto a la composición en aminoácidos, la gliadina posee cantidades importantes de residuos apolares y neutros, principalmente glutamina (alrededor del 40%), un elevado contenido en prolina (14%) y una baja proporción en aminoácidos cargados [6].

Las interacciones adhesivas que caracterizan a las nanopartículas de gliadina pueden ser debidas al desarrollo de puentes de hidrógeno entre los grupos amino de la glutamina y los grupos polares de la mucosa. Sin embargo, la gliadina también posee una importante cantidad de aminoácidos apolares que pueden ser utilizados para el desa-

rollo de uniones hidrofóbicas con dominios hidrofóbicos de la mucosa [7].

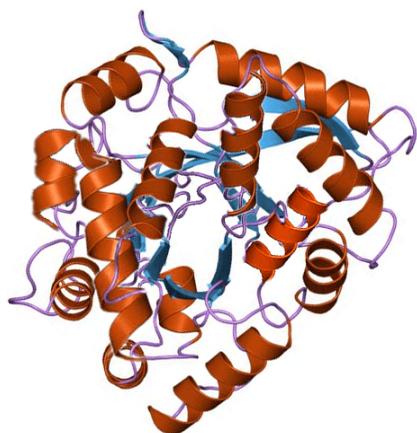


Fig. 1. Estructura proteica tridimensional de la gliadina [5].

Dichas partículas son interesantes para el desarrollo de nuevos tratamientos en relación a patologías asociadas al estómago como úlceras (promoviendo la erradicación de la bacteria patógena *Helicobacter pylori*), como vector de liberación de fármacos en tratamientos oncológicos, y como vías de tratamiento inmunomodulador en la enfermedad celiaca.

### 3. USO DE NANOPARTÍCULAS DE GLIADINA EN MEDICINA

#### 3.1. Aplicación en patologías estomacales

Con el fin de saber más acerca del comportamiento y potencial bioadhesivo de las nanopartículas de gliadina en el tracto gastrointestinal, particularmente en el estómago, se llevó a cabo un estudio consistente en la administración de nanopartículas de gliadina marcadas con carbazol (las cuales tenían un tamaño aproximado de 450 nm), mediante vía oral, a ratas de la línea de laboratorio "Wistar" [1]. El carbazol es un marcador fluorescente que puede ir asociado a las nanopartículas, de forma que permite cuantificar mediante espectrofluorimetría la presencia de estas en una localización determinada. Tras la administración, se sacrificaron por dislocación cervical estos animales modelo, retirándoles el tracto gastrointestinal, el cual fue dividido en tres regiones anatómicas: estómago, intestino delgado y ciego. Además, se abrieron las mucosas y se lavaron con solución salina para eliminar la fracción de nanopartículas no adherida a estas. Finalmente se extrajo el carbazol mediante adición de metanol y centrifugación. Se realizaron rectas de calibrado para estudiar la adhesión obtenida para las nanopartículas empleadas. La cantidad de nanopartículas adheridas a la mucosa gastrointestinal se calculó a partir de la cuantificación del marcador fluorescente encontrado en cada uno de los segmentos del tracto. Transcurridos 30 minutos tras su administración a los animales, alrededor del 25% de la dosis inicial se encontraba adherida a la mucosa del tracto gastrointestinal. Más del 80% de esa fracción adherida se localizaba en el

estómago. Aunque el perfil bioadhesivo no variaba con el tiempo, transcurrida 1 hora desde la administración de las nanopartículas, únicamente el 8% de la dosis inicial podía encontrarse aún en el estómago. Aún así, la presencia de nanopartículas adheridas a la mucosa del intestino o del ciego era despreciable, incluso en el momento de la administración, concluyéndose el potencial y característico efecto bioadhesivo que poseen las nanopartículas de gliadina en el estómago con respecto a las otras zonas del tracto (Fig. 2).

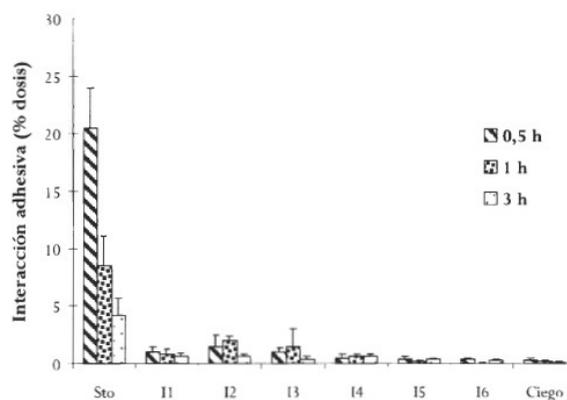


Fig. 2. Perfil bioadhesivo de las nanopartículas de gliadina tras la administración oral en ratas "Wistar". Sto: estómago, I (1 a 6): porciones intestinales, Ciego: ciego. Extraída de Arangoa *et al.*, 2004 [1].

#### 3.2. Aplicación en tratamientos oncológicos

Los vectores portadores de medicamentos juegan un papel importante en los controles de toxicidad inespecífica de medicamentos libres, que son poco solubles e inestables. Para reducir la toxicidad inespecífica de los medicamentos contra el cáncer estos pueden cargarse en una nanopartícula que los dirijan a las células tumorales.

Varios tipos de agentes terapéuticos han sido empleados en la terapia contra el cáncer. Un ejemplo es la ciclofosfamida, la cual se ha utilizado para tratar el retinoblastoma, el neuroblastoma, el cáncer de pulmón y el cáncer de pecho [8]. Aunque la ciclofosfamida es efectiva para la terapia contra el cáncer, esta daña los tejidos. Para combatir este problema, la ciclofosfamida ha sido cargada dentro de nanopartículas que, de forma segura, entregan el medicamento a su diana, evitando, además, la temprana degradación de este debida al ambiente ácido del tracto digestivo.

Gulfam y su grupo de investigación demostraron en 2012 que nanopartículas de gliadina cargadas con fármacos contra el cáncer podían adherirse a la superficie de las células cancerosas para inducir la apoptosis, dado el potencial muco-bioadhesivo de la gliadina [8]. En concreto, se concluyó que nanopartículas de gliadina cargadas con ciclofosfamida inducirían la apoptosis de células del cáncer de mama con la consecuente inhibición del crecimiento tumoral, confirmando dicho efecto apoptótico posteriormente mediante un análisis de transferencia Western blot.

Es por tanto que, según los resultados del estudio, las nanopartículas de gliadina cargadas con fármacos contra el cáncer podrían ser una herramienta poderosa a aplicar en posibles terapias anticancerosas.

### 3.3. Aplicación en tratamientos de celiaquía

El uso de nanopartículas de gliadina para tratar la celiaquía es una terapia bastante novedosa, basada en la capacidad de estas partículas de actuar como moduladores del sistema inmunológico [9].

La celiaquía, que afecta hoy en día al 0,3-2,4% de la población mundial, es una afección causada por el daño al revestimiento del intestino delgado derivado de una reacción a la indigestión del gluten. Gluten es el nombre que reciben las proteínas de almacenamiento o reserva contenidas en el trigo, la cebada y el centeno. A su vez, la fracción del gluten del trigo soluble en alcohol corresponde con la gliadina.

La predisposición a desarrollar la enfermedad celiaca puede conducir a la pérdida de la tolerancia inmune a la gliadina durante la infancia, la adolescencia o la edad adulta. Dicha pérdida de tolerancia es causada por un fallo en la regulación de los linfocitos T específicos de la gliadina dentro del sistema inmune, que conlleva la destrucción de la mucosa intestinal. La principal solución hasta el momento para la enfermedad celiaca consiste en llevar una dieta libre de gluten.

Ante esta situación, el inmunólogo Tobias Freitag y su equipo de investigación han desarrollado y probado unas nanopartículas de poli(láctico-co-glicólico) que contienen gliadina para el tratamiento inmunomodulador de la enfermedad [9]. En su estudio observó que cuando las nanopartículas (de forma esférica y con 500 nm de tamaño) se inyectan en la sangre de ratones con diferentes modelos de la enfermedad se produce una reducción significativa de los marcadores de activación de las células T específicas de gliadina, de la inflamación, y del daño tisular. La absorción de estas nanopartículas por las células presentadoras de antígeno induce tolerancia inmune. Otra observación tras el tratamiento con estas nanopartículas fue la inducción de perfiles de expresión génica asociados con la tolerancia inmune.

Estas consideraciones respaldan el concepto de que es posible reprogramar el sistema inmune en pacientes celíacos instruyendo a los linfocitos T para que toleren el gluten nuevamente, pudiendo ser este tipo de tratamientos una posible vía para la cura de la enfermedad.

### 3.4. Otras aplicaciones

Se sabe que el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E actúa como un fuerte antioxidante para prevenir la acumulación de peróxidos celulares. La exposición a especies reactivas de oxígeno induce un aumento de la peroxidación de lípidos que puede causar lesiones en diferentes partes del cuer-

po. Promueve, por ejemplo, cataratogénesis, enfermedades cardiovasculares derivadas de la toxicidad de los peróxidos lipídicos hacia las células endoteliales de los vasos sanguíneos, o daños en la piel relacionados con la pérdida de inmunidad celular (promoviendo el envejecimiento prematuro de esta, un incremento de su fragilidad, e incluso el desarrollo de melanomas) [10].

La vitamina E parece ser una de las encargadas de eliminar radicales libres por su acción antioxidante, previniendo el daño agudo o crónico. Sin embargo, el  $\alpha$ -tocoferol es degradado en presencia de oxígeno y debe protegerse de la luz, el calor y el contacto prolongado con el aire, lo que debe ser tenido en cuenta a la hora de desarrollar las formas de administración de este.

Con el objetivo de superar dichos inconvenientes se formularon, como sistema interesante para la liberación controlada de vitamina E, vectores portadores realizados en base a nanopartículas de gliadina. La gliadina posee la capacidad de interactuar con la queratina epidérmica, debido a su riqueza en prolina. Aprovechando esta capacidad de interacción se desarrollaron nanopartículas de gliadina conteniendo vitamina E (de un diámetro medio de 900 nm). Estas nanopartículas han demostrado ser eficaces como vectores portadores, con una eficiencia de encapsulamiento de la vitamina E de al menos un 77% [10].

## 5. CONCLUSIONES

A la luz de todas las novedosas aplicaciones médicas que están surgiendo de la investigación con las nanopartículas de gliadina, y la traducción de estas investigaciones en resultados exitosos, puede afirmarse que este campo de investigación es potencialmente interesante como para ser un nuevo foco de búsqueda de tratamientos frente a otras muchas enfermedades. Basándose en estas nanopartículas podrá ampliarse en un futuro la investigación hacia un abanico más grande de, por ejemplo, cánceres, o tratar de dilucidar los mecanismos para hacerlas finalmente efectivas frente a enfermedades gastrointestinales de la mucosa del intestino o del ciego, logrando ampliar el rango de afecciones a tratar con esta eficiente técnica.

Se concluye que las nanopartículas de gliadina ofrecen un enorme potencial en el ámbito biomédico, principalmente debido a su naturaleza orgánica, presentando interés por su elevada biocompatibilidad. Su empleo asegura una eficacia en los tratamientos y la reducción de los efectos secundarios derivados de los procedimientos actuales.

## REFERENCIAS

- [1] Arangoa, M.A., Campanero, M.A. and Irache, J.M., "Potencial bioadhesivo de las nanopartículas de gliadina en el estómago", *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, vol. 33, no. 1, pp. 38-47, 2004. ISSN: 1909-6356.
- [2] Park, K. and Robinson, J.R., "Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: method to study bioadhesion", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 19, pp. 107-127,

- 1984, doi: 10.1016/0378-5173(84)90154-6.
- [3] Gu, J.M, Robinson, J.R. and Leung, H.S., "Binding of acrylic polymers to mucin-epithelial surfaces. Structure/property relationship", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 5, no. 1, pp. 21-67, 1998, PMID: 3293807.
- [4] Duchêne, D. and Ponchel, G., "Bioadhesion: A new pharmaceutical method for improving therapeutic efficiency", *STP Pharmatheatical*, vol. 5, no. 12, pp. 830-838, 1989.
- [5] Web de Wikipedia. Artículo "Gliadina". <https://es.wikipedia.org/wiki/Gliadina>
- [6] Byers, M., Mifflin, J. and Smith, S.J., "A quantitative comparison of the extraction of protein fractions from Wheat grain by different solvents, and of the polypeptide and aminoacid composition of alcohol-soluble proteins", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 34, pp. 447, 1983, doi: 10.1002/jsfa.2740340506.
- [7] Arangoa, M.A., Campanero, M.A., Renedo, M.J., Ponchel, G. and Irache, J.M., "Gliadin nanoparticles as carriers for the oral administration of lipophilic drugs. Relationships between bioadhesion and pharmacokinetics", *Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 11, pp. 1521-1527, 2001, doi: 10.1023/a:1013018111829.
- [8] Gulfam, M., Kim, J., Lee, J.M., Ku, B., Chung, B.H., Chung, B.G., "Anticancer Drug-Loaded Gliadin Nanoparticles Induce Apoptosis in Breast Cancer Cells", *Langmuir*, vol. 23, no. 21, pp. 8216-8223, 2012, doi: 10.1021/la300691n.
- [9] Freitag, T.L., Podojil, J.R., Pearson, R.M., Fokta, F.J., Sahl, C., Messing, M., Andersson, L.C., Leskinen, K., Saavalainen, P., Hoover, L.I., Huang, K., Phippard, D., Maleki, S., King, N.J.C., Shea, L.D., Miller, S.D., Meri, S.K. and Getts, D.R., "Gliadin Nanoparticles Induce Immune Tolerance to Gliadin in Mouse Models of Celiac Disease", *Gastroenterology*, vol. 158, no. 6, pp. 1667-1681, 2020, doi: 10.1053/j.gastro.2020.01.045.
- [10] Duclairoir, C., Orecchioni, A.M., Depraetere, O. and Nakache, E., " $\alpha$ -Tocopherol encapsulation and *in vitro* release from wheat gliadin nanoparticles", *Journal of Microencapsulation*, vol. 19, no. 1, pp. 53-60, 2002, doi: 10.1080/02652040110055207.



**Beatriz Pacheco-Sánchez y Miguel Salazar-Martínez**, ambos graduados en Biotecnología por la Universidad de Almería en 2019, cursan actualmente la modalidad de Nuevos Fármacos del Máster en Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

# Un enfoque general de las nanovacunas

Ana Batanero Mantero, Ana Gil López

**Resumen**—Con el avance de la tecnología y la necesidad de desarrollar nuevas vacunas más seguras y eficientes, se empezaron a desarrollar antígenos expresados de forma recombinante. Estas vacunas, aunque son más tolerables, son menos inmunogénicas, por lo que para aumentar la inmunogenicidad se han utilizado diferentes sistemas de administración de antígeno o adyuvantes. En este sentido, la nanotecnología está siendo de gran utilidad en el desarrollo de vacunas, para la profilaxis de diversas enfermedades infecciosas, así como para el tratamiento de otras patologías como el cáncer.

**Palabras Claves**—Adyuvantes, Antígeno, Nanotecnología, Nanovacunas, Profilaxis.



## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, las vacunas han resultado ser una estrategia farmacológica eficaz y segura para erradicar o disminuir la presencia de muchas enfermedades. El concepto de vacunación nació como consecuencia de los experimentos realizados por Edward Jenner, que en el siglo XVIII demostró que personas infectadas por viruela y que se recuperaban al inocular fluido varioloso bovino, quedaban inmunizadas frente a la variante humana de la enfermedad. Además, evidenció que el fluido de las lesiones que aparecían tras la inoculación se podía usar para inmunizar a otra persona [1].

Las vacunas son productos biológicos que tienen como finalidad generar una respuesta inmune y memoria inmunológica efectiva, para así evitar los efectos nocivos de la enfermedad a la que están dirigidas y prevenir dicha enfermedad en personas vacunadas [1].

En la actualidad, la mayoría de las vacunas que se administran están basadas en el uso de microorganismos inactivados o vivos atenuados, pero estas presentan peligros de reversión del organismo cuestionando, en ocasiones, su seguridad y efectividad [2]. El avance de la tecnología y la necesidad de desarrollar nuevas vacunas con mayor seguridad y eficiencia para tratar enfermedades ya conocidas y enfermedades emergentes, como el COVID-19, ha desencadenado la búsqueda de nuevas estrategias, siendo una de ellas el uso de la nanotecnología [3].

## 2. DESARROLLO DE NANOVACUNAS

La nanotecnología es el campo de la ciencia que se ocupa de los objetos que tienen un tamaño nanométrico. Una nanopartícula es un objeto individual dentro de la nanoescala que puede funcionar como unidad independiente. Los materiales que se utilizan para la síntesis de las nanopartículas (NPs) son muy diversos, como polímeros orgánicos, materiales inorgánicos y macromoléculas biológicas [4].

El desarrollo de nuevas vacunas más seguras y eficientes ha sido posible gracias al avance de la tecnología. La

estrategia fundamental para ello fue el desarrollo de antígenos recombinantes, que permitieron la síntesis de vacunas de subunidades. Estas vacunas, a pesar de ser más tolerables, tienen poca inmunogenicidad, por lo que se han empleado distintos sistemas de administración del antígeno o adyuvantes, para estimular, reforzar y alargar la respuesta inmune aumentando la eficacia de la vacuna. De estos sistemas existen dos tipos: los inmunoestimuladores, que estimulan el sistema inmunitario; y los sistemas de administración, que transportan y presentan la vacuna al sistema inmunitario del huésped [1], [4]. En este punto, entra en juego la nanotecnología, que se puede usar como potenciador de la respuesta inmune o como sistema de transporte del antígeno hasta su lugar de acción. Además de la posibilidad de transportar el adyuvante y el antígeno juntos, para potenciar la respuesta inmune. Para esta función de vectorización, es muy importante que haya una buena asociación entre el antígeno y la nanopartícula. Esta asociación puede ocurrir por adsorción física, basada en interacciones hidrofóbicas de modo que, al ser interacciones débiles, la disociación ocurre rápidamente in vivo. Existen otros métodos más complejos como la conjugación química o la encapsulación, que generan uniones más fuertes. En la encapsulación, los antígenos se mezclan con los precursores de nanopartículas de manera que se constituye una nanopartícula en la que el antígeno ocupa su interior. De este modo, el antígeno solo se libera cuando la nanopartícula se degrada. En el caso de la conjugación química, el antígeno está unido por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula, de modo que la nanopartícula entra en la célula y el antígeno es liberado una vez dentro de esta. Con respecto a las nanopartículas que actúan como potenciadoras del sistema inmune, esta asociación entre antígeno y nanopartícula no es tan necesaria [5], [6].

Desde hace años, empleando distintos materiales (Tabla 1) y con distintos enfoques, la nanotecnología ha sido partícipe del desarrollo de distintas vacunas.

TABLA 1  
TIPOS DE MATERIALES EMPLEADOS PARA EL DESARROLLO DE NANOVACUNAS.

Tipo	Características
<b>Liposomas (orgánicas)</b>	Están formados por fosfolípidos no tóxicos y biodegradables. Son un sistema seguro y eficaz para administrar antígenos y como adyuvantes, ya que permiten aumentar la respuesta inmune. Un tipo de liposomas son los liposomas catiónicos, los cuales establecen interacciones electrostáticas con membranas celulares, aumentando la posibilidad de que las células presentadoras de antígenos fagociten las partículas [3], [4], [6].
<b>Poliméricas (orgánicas)</b>	Dentro de estos materiales destacan las nanopartículas basadas en ácido poliglicólico y poli (ácido-L(+)-láctico-co-glicólico) (PLGA) por su biocompatibilidad y biodegradabilidad. El uso de polímeros permite encapsular antígenos, conjugar los polímeros con la superficie del antígeno o mezclarse con este. Entre las ventajas cabe destacar que se degradan lentamente cuando se exponen al agua permitiendo que se puedan proteger pequeñas moléculas y moléculas biológicas cargadas, ya sean hidrofóbicas o hidrofílicas, y liberarlas durante un tiempo determinado, generando una respuesta inmune celular y humoral de duración larga [3], [4].
<b>De oro (inorgánicas)</b>	Las propiedades físicas y químicas de este elemento químico permiten que se formen nanopartículas de diferentes tamaños y formas. Además, en la nanoescala presentan propiedades ópticas únicas que han sido de interés para su uso en la administración de fármacos y terapia fototérmica [3], [4].
<b>Nanotubos de carbono (CNTs) (inorgánicas)</b>	Los CNTs presentan un área superficial grande, lo cual hace que sean excelentes exhibidores de antígenos repetitivos potenciales. Además, resulta fácil la adsorción y conjugación de antígenos a su superficie, y son muy inmunogénicos, pudiendo funcionar como sistemas de administración de antígenos y como inmunopotenciadores. Los CNTs estimulan el sistema inmune innato, lo cual les confiere propiedades adyuvantes inherentes. Además, su dimensión nanométrica permite que se internalicen por las células fácilmente [3], [4], [7], [8].
<b>De sílice (inorgánicas)</b>	Son nanomateriales biocompatibles con excelentes propiedades como nanoportadores, que se pueden desarrollar tanto en forma mesoporosa, como hueca. El tamaño y la forma son controlables en función de las condiciones de reacción, lo cual permite ajustar parámetros estructurales. Los diferentes grupos silanol, presentes en la superficie, permiten que se realicen modificaciones adicionales. Esto resulta ser una ventaja ya que posibilita que se mejoren y se obtengan otras propiedades, como reconocimiento celular y absorción de biomoléculas específicas. Se han utilizado como nanotransportadores y como adyuvantes para la liberación de antígenos de manera efectiva [6].
<b>NPs de proteínas autoensambladas (SAPN)</b>	Son pantallas de antígenos repetitivos diseñados racionalmente. Las partículas individuales son similares a virus pequeños con un tamaño de, aproximadamente, 25 nm. Esto conlleva que estas nanopartículas resulten ser excelentes agentes inmunoestimulantes y buenos candidatos para diferentes tipos de vacunas [3], [4].
<b>Partículas similares a los virus (VLPs)</b>	Son un tipo de SAPN, que carecen de ácido nucleico infeccioso y están formadas por el autoensamblado de proteínas biocompatibles de la cápside viral. Son el tipo de sistema de nanovacuna ideal, ya que se basan en la utilización de la estructura viral optimizada para que interactúe con el sistema inmune, pero evitando los componentes infecciosos. Presentan la ventaja de inducir una respuesta inmunitaria potente, incluso sin adyuvante [6].
<b>Emulsiones</b>	La administración de emulsiones en tamaño nanométrico se utiliza como adyuvante. Las emulsiones pueden incluir antígenos en sus núcleos para aumentar la eficiencia de la vacuna o utilizarse simplemente para mezclarlas con el antígeno. Pueden utilizarse en diferentes formas, como en aceite o en agua, y el tamaño puede variar de 50 a 600 nm. Se ha demostrado que la síntesis de nanoemulsiones biocompatibles mediante el autoensamblaje, permite la vectorización del antígeno proteico a las células dendríticas [6].
<b>Complejos inmunoestimulantes (ISCOMs)</b>	Son complejos esféricos miscelares de un tamaño de 40 nm basados en una matriz del adyuvante saponina (Quil A o QS21) junto con colesterol y fosfolípidos (generalmente fosfatidiletanolamina) que engloban a la proteína antigénica por interacciones apolares. Existen distintos antígenos empleados en esta construcción como son los derivados de influenza, herpes virus simple, malaria, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la enfermedad de Newcastle. Una variante de ISCOMs son los ISCOMATRIX. Se diferencian en que en la vacuna ISCOM el antígeno se incorpora durante la formación del adyuvante ISCOM, mientras que en la formación de ISCOMATRIX el antígeno se mezcla con un adyuvante ISCOMATRIX ya preformado. Así, se consigue eliminar las limitaciones existentes en el caso de los antígenos hidrofóbicos [2], [6], [9].

En nanovacunología existe un rango de tamaño de 1-1000 nm (Figura 1) que ha permitido el desarrollo de distintas alternativas para el diseño de vacunas profilácticas y para el tratamiento de otras patologías, como cáncer, Alzheimer, hipertensión y adicción al tabaco [6].

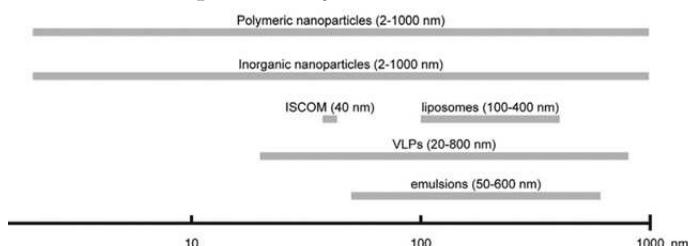


Fig. 1. Rango de tamaños que la nanotecnología aplica en el desarrollo de vacunas [6].

De todos los tipos de vacunas que aplican la nanotecnología, las primeras en alcanzar el mercado fueron las VLPs. En concreto, para la profilaxis del virus de la hepatitis B, siendo comercializada en 1986 [6]. Desde ese momento, las investigaciones y aplicaciones en nanotecnología no han cesado, existiendo numerosos tratamientos basados en la nanovacunología. Algunos ejemplos son los siguientes:

- Con la encapsulación en liposomas catiónicos junto a la proteína antigénica GBS67 de *Streptococcus* del grupo B, se ha comprobado que la administración de antígeno y adyuvante en bajas dosis en una nanopartícula potencia la respuesta inmune en mayor medida [5].
- Las nanovacunas de tipo SAPN, se han utilizado para enfermedades virales como la gripe aviar, SARS y VIH. Además, han demostrado ser inmunogénicas y

- tener capacidad de inducir protección contra la exposición de *Toxoplasma gondii* en un modelo murino [4].
- En el Instituto de Investigación Biomédica de Valde-cilla, se ha utilizado la nanotecnología para desarrollar y estudiar una vacuna con nanopartículas de oro cargadas con un péptido de *Listeria monocytogenes* para el tratamiento y prevención de melanoma. Por lo tanto, no sólo se están desarrollando nanovacunas para enfermedades infecciosas, sino que también, se está aplicando a otras ramas de la biomedicina, como el tratamiento del cáncer [10].

### 3. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS Y SU INFLUENCIA EN LA EFECTIVIDAD

En el proceso de diseño de vacunas basadas en nanopartículas existen una serie de propiedades que pueden influir en la efectividad. Entre ellas, el material que constituye las nanopartículas. Materiales de mayor peso molecular derivan en una disminución de la liberación del antígeno. También, según el material empleado se puede generar una doble presentación antigénica, como se ha podido comprobar en nanogeles de PLGA cargados de ovoalbúmina o cubiertos de protamina, que derivan en una mayor respuesta inmune [11]. Con respecto a la estructura, las nanopartículas pueden presentar grupos funcionales que favorezcan la viabilidad o que permitan el direccionamiento hacia una diana específica [11]. En el caso de vacunas basadas en ADN o ARN, se deben proteger de medios ácidos y reductores, lo que se puede conseguir usando péptidos [11].

Otra propiedad que va a intervenir en la efectividad es el tamaño, que a su vez se relaciona con la vía de administración [11], [12]. Las nanopartículas de menos de 5 nm salen fácilmente de la circulación a través del sistema renal, mientras que las de mayor tamaño (20 - 200 nm) tienen un tiempo de circulación más prolongado [12]. Por otro lado, las formulaciones de nanopartículas adecuadas al sitio de inyección, pueden mejorar significativamente la absorción del antígeno y la presentación por parte de las células dendríticas, aumentando así la inmunogenicidad de estas formulaciones de nanopartículas. Las nanopartículas de mayores tamaños, tienen más probabilidad de ser capturadas por el sistema de fagocitos mononucleares, como macrófagos y células de Kupffer del hígado [12]. Nanopartículas de 10-100 nm al ser inyectadas en los tejidos por diferentes vías, son transportadas fácilmente a través del endotelio linfático por el líquido intersticial [12]. Además, las nanopartículas con diámetro mayor de 100 nm son captadas por las células dendríticas en el lugar de la administración y viajan hasta los nódulos linfáticos, pero no son capaces de atravesar las barreras de las mucosas. En cambio, las de menos de 50 nm pueden llegar hasta los vasos linfáticos donde son captadas por las células dendríticas y pueden atravesar las barreras de las mucosas [11]. Por otro lado, la efectividad del tamaño va directamente ligada al tipo de material, por ejemplo: si son de poliestireno, el tamaño óptimo está por debajo de los 500 nm; para el PLGA el tamaño ideal son 300 nm aproximadamente; y para el ácido poliláctico sería entre

200-600 nm [11].

La forma geométrica es otro factor que va a afectar a las propiedades mecánicas de las nanopartículas. En términos generales, a mayor área de contacto entre nanopartícula y membrana plasmática se favorece el anclaje de la nanopartícula. Las nanopartículas esféricas y cilíndricas son más fagocitadas que las que presentan forma de disco o eclipse. Las alargadas son capaces de evitar la fagocitosis durante más tiempo, y junto a las planas, son dirigidas mejor a la diana que las nanopartículas esféricas [11], [12]. Como ejemplo, las nanopartículas de oro con forma de varilla, que presentan más eficiencia de absorción por las células dendríticas, que las que tienen forma esférica o de cubo [11], [12].

La carga en la superficie de las nanopartículas también tiene repercusión en la efectividad de la vacuna, ya que puede afectar a la adhesión en tejidos, la capacidad de carga, la estabilidad y el comportamiento in vivo. Si la carga es negativa y se encapsula ADN, la estabilidad y eficacia serán bajas, mientras que con carga positiva el proceso se ve favorecido. Por otro lado, las células dendríticas atraen antes a las nanopartículas catiónicas al interactuar con las membranas aniónicas de las células, lo cual puede conllevar que se produzca hemólisis o agregación plaquetaria [1], [6], [12].

Por último, existen estudios que demuestran que materiales que presentan dominios hidrófobos, como los biopolímeros, son capaces de actuar por sí mismos como adyuvantes. No obstante, pueden interactuar con proteínas plasmáticas reduciendo la fagocitosis y, por tanto, su función. Para evitarlo, pueden anclarse a la superficie cadenas de polímero hidrofílico tipo polietilenglicol, aunque si sus cadenas son muy largas se pueden alterar las propiedades de las nanopartículas [11].

### 4. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Desde el desarrollo de las primeras vacunas se han realizado grandes avances en este campo gracias a los progresos en técnicas biológicas, permitiendo obtener vacunas más seguras y en menor tiempo. Debido a los brotes de enfermedades infecciosas ya existentes y otras emergentes que suponen una amenaza para la salud pública, resulta importante aplicar el desarrollo de nuevas tecnologías, como la nanotecnología. El objetivo de ello es conseguir un rápido desarrollo e implementación de vacunas, ya que además de inmunidad individual, con la vacunación se consigue inmunidad colectiva. Además, no sólo se ha visto la utilidad de las nanovacunas en el campo de las enfermedades infecciosas, si no que también ha resultado tener aplicabilidad en otros campos de la medicina, como en la oncología [4].

Una de las aplicaciones de futuro inmediato que se está investigando es el desarrollo de una vacuna frente al SARS-Cov-2. A fecha de 30 mayo de 2020, la OMS incluye entre los candidatos a vacunas en ensayo clínico, tres basados en nanotecnología. Dos de ellos se tratan de nanopartículas lipídicas mientras que la otra estrategia está basada en una nanopartícula que incluye un adyuvante junto con antígeno [13]. Las basadas en nanopartículas

lipídicas encapsulan ARNm. Una de ellas (mRNA-1273), desarrollada por la empresa Moderna, se encuentra en fase 2 de estudio y se basa en la vectorización de ARNm de la proteína S de la superficie del virus [14]. La otra estrategia, en fase 1/2, está basada en el trabajo conjunto de tres empresas, BioNTech, Fosun Pharma y Pfizer. Los candidatos BNT162a1, BNT162b1, BNT162b2 y BNT162c2 se basan en distintas formulaciones de ARNm que codifican para la proteína S o para el dominio de unión al receptor (RDB) de la proteína S [15]. Por último, la estrategia de la empresa Novavax (NVX-CoV2373) que está en fase 1/2. Se basa en una nanopartícula que incluye una glicoproteína recombinante de SARS-CoV-2 junto con el adyuvante Matrix-M™, de esta misma empresa, que aumenta la respuesta inmune y estimula altos niveles de anticuerpos neutralizantes [16].

## 5. CONCLUSIONES

El uso de la nanotecnología ha supuesto una revolución en el campo de la biomedicina, ya que ha permitido desarrollar nuevas y prometedoras vacunas, debido al alto potencial para la presentación de antígenos y para incorporar diferentes nanomateriales como adyuvantes. Esta aplicación permite considerar una nueva estrategia para tratar enfermedades infecciosas o para el cáncer, entre otras enfermedades. Sería interesante seguir investigando en este ámbito para buscar otras aplicaciones de las nanovacunas, obtener más datos acerca de la relación eficacia-efectividad, así como de la toxicología y reacciones adversas que implican el uso de los diferentes nanomateriales. Cabe destacar la aplicación que está teniendo actualmente la nanotecnología en el desarrollo de vacunas para tratar la COVID-19, como es el caso de las ya comentadas anteriormente, lo cual permitiría conseguir inmunidad de grupo, siendo esto esencial para hacer frente a la pandemia.

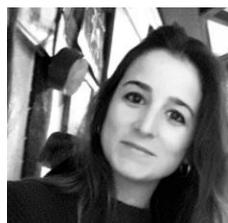
## REFERENCIAS

- [1] Consejo General de Colegio Farmacéuticos. "Conceptos generales de vacunas y vacunación del viajero", Curso a distancia, 2019.J
- [2] Corriera Pinto, Jorge Filipe, "Nanovacunas: Diseño de nanoestructuras para inmunización," Tesis Doctoral, Dept. de farmacia y tecnología farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 2015.
- [3] Consejo General de Colegios Farmacéuticos "Medicamentos biológicos: innovadores y biosimilares" Curso a distancia, 2019.
- [4] Karch CP and Burkhard P, "Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies," *Biochem Pharmacol*, vol. 120, pp. 1-14, Nov 2016, doi: 10.1016/j.bcp.2016.05.001.
- [5] Chatzikleantous D, Schmidt ST, Buffi G, Paciello I, Cunliffe R, Carboni F, Romano MR, O'Hagan DT, D'Oro U, Woods S, Roberts CW, Perrie Y and Adamo R, "Design of a novel vaccine nanotechnology-based delivery system comprising CpGODN-protein conjugate anchored to liposomes," *J Control Release*, vol. 323, pp. 125-137, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.001.

- [6] Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middelberg AP, "Nanoparticle vaccines," *Vaccine*, vol. 32, no. 3, pp. 327-37, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.11.069.
- [7] Gottardi R and Douradinha B, "Carbon nanotubes as a novel tool for vaccination against infectious diseases and cancer," *J Nanobiotechnology*, vol. 11, pp. 30, Sept. 2013, doi: 10.1186/1477-3155-11-30.
- [8] Scheinberg DA, McDevitt MR, Dao T, Mulvey JJ, Feinberg E, Alidori S, "Carbon nanotubes as vaccine scaffolds," *Adv Drug Deliv. Rev*, vol. 65, no. 15, pp. 2016-2022, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.07.013.
- [9] Siel D, Vidal S and Sáenz, L, "Principales sistemas de entrega de antígenos en Medicina Veterinaria y Humana," *Avances en Ciencias Veterinarias*, vol. 29, no. 1, pp. 50-69, 2014. doi: 10.5354/0719-5273.2014.32410
- [10] C Álvarez-Domínguez, "Estudio de una nueva inmunoterapia para tumores sólidos con nanopartículas de oro basadas en *Listeria monocytogenes*," Instituto Marqués de Valdecilla (IDI-VAL), Santander, Cantabria.
- [11] Blanco Ortiz, Adrián, "Nanomateriales para el desarrollo de nuevas vacunas," Trabajo Fin de Grado, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, 2019.
- [12] Lung P, Yang J and Li Q, "Nanoparticle formulated vaccines: opportunities and challenges," *Nanoscale*, vol. 12, no. 10, pp. 5746-5763, Mar. 2020, doi: 10.1039/c9nr08958f.
- [13] Web de la Organización Mundial de la Salud. Draft landscape of COVID-19 candidate vaccines- 30 May 2020. <https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- [14] Web de Moderna. <https://www.modernatx.com/modernas-work-potential-vaccine-against-covid-19>
- [15] Web de Genetic Engineering & Biotechnology News. BioNtech, Pfizer and Fosun Pharma-BNT162. <https://www.genengnews.com/covid-19-candidates/biontech-pfizer-and-fosun-pharma-bnt162/>
- [16] Web de Novavax. Novavax Initiates Phase 1/2 Clinical Trial of COVID-19 Vaccine. <http://ir.novavax.com/news-releases/news-release-details/novavax-initiates-phase-12-clinical-trial-covid-19-vaccine>



**Ana Batanero Mantero.** Natural de Valverde del Camino (Huelva). Graduada en Biomedicina Básica y Experimental por la Universidad de Sevilla (2015-2019). Actualmente, cursando el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria en el itinerario Nuevos Fármacos de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).



**Ana Gil López.** Natural de Mérida. Graduada en Farmacia por la Universidad de Salamanca (2010-2015). Actualmente, cursando el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria en el itinerario Nuevos Fármacos de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

# ¿INMUNOSUPRESORES PARA LA ENFERMEDAD DE CROHN?

María Sánchez Ros

**Resumen**—La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto digestivo. Esta enfermedad no tiene una causa conocida pero hay diversos factores que pueden afectar a su aparición. Estos factores son los factores genéticos, ambientales y microbiológicos. Tiene numerosos tratamientos pero los principales son los corticoides e inmunosupresores, ya que en esta enfermedad se ve afectado el sistema inmune. Los principales inmunosupresores utilizados para su tratamiento son la azatioprina y la 6-mercaptopurina que reducen la respuesta inmunológica. En los enfermos de Crohn, hay una sobreexpresión de los receptores de tipo Toll (TLR) que estimula una respuesta inflamatoria, por lo que utilizando estos inmunosupresores reducimos esta sobreexpresión.

**Palabras Claves**— Enfermedad de Crohn, Inmunosupresores, Azatioprina, TLR.

## 1. ¿QUÉ ES LA ENFERMEDAD DE CROHN?

Principalmente, es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto gastrointestinal. Puede aparecer varias veces durante la vida y algunos pacientes pueden presentar largos períodos de remisión, en los que no presentan ninguno de los síntomas. Puede afectar a cualquier parte del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, aunque afecta más frecuentemente al intestino delgado (íleon) y al comienzo del intestino grueso (colon). Por lo que los síntomas comunes de la enfermedad de Crohn incluyen cólicos, diarrea, pérdida de peso, hinchazón, dolor o secreción anal, lesiones cutáneas, etc. No todos los pacientes presentan los mismos síntomas.

Esta enfermedad afecta tanto a hombres y mujeres por igual, pero la mayoría de los pacientes tienen entre los 16 y los 40 años. Observando las estadísticas, entre un 20% de las personas que padecen la enfermedad de Crohn tiene un familiar, un hermano o hermana más frecuentemente y, a veces el padre, la madre o un hijo, que también la padece.

¿Cuáles son las causas? En este momento se desconoce la causa exacta, aunque hay algunas teorías que se centran en la causa inmunológica, genética o en una causa bacteriana. Se suelen utilizar varias pruebas para diagnosticar la enfermedad, el médico le preguntará las medicinas que está tomando y sus antecedentes familiares, y le hará un examen físico comprobando si tiene hinchado el abdomen, escuchará los sonidos del abdomen y dará pequeños golpes o palpará su abdomen para saber si le duele o lo tiene sensible. Luego, se realizarán pruebas diagnósticas como las pruebas de laboratorio o colonoscopia. Se suelen realizar más pruebas para descartar otras enfermedades, como la colitis ulcerosa, que causa síntomas parecidos.

¿Cómo tratar la enfermedad de Crohn? No existe una cura para la enfermedad, aunque el tratamiento es casi siempre con medicamentos. Los medicamentos que se suelen recetar más comúnmente son los corticosteroides y varios antiinflamatorios. Otros fármacos usados en ocasiones son los inmunosupresores, como por ejemplo la azatioprina, que anula las funciones del organismo. También existen los tratamientos biológicos entre los que más destacan y mejores resultados ha obtenido es el infliximab. En los casos más avanzados se suele recomendar la cirugía, en complicaciones tales como una perforación del intestino,

obstrucción del intestino o hemorragia considerable. [1][2]

¿Y la pregunta que me plateé es, ¿por qué el uso de inmunosupresores?

## 2. INMUNOSUPRESOR

Un inmunosupresor es un fármaco que reduce la actividad del sistema inmune, que es la principal defensa del organismo. En la enfermedad de Crohn, la respuesta inmunológica puede estar afectada, por lo que se usan estos fármacos, disminuyendo así la inflamación. Son eficaces para el mantenimiento de la enfermedad inactiva. [3] Pero, ¿cuál es el principal defecto del sistema inmune en los enfermos de dicha enfermedad?

## 3. INTERACCIÓN FLORA INTESTINAL-SISTEMA INMUNE

Para ello, voy a centrarme en la interacción flora-sistema inmune, el intestino humano tiene una microflora que comienza a crecer en el nacimiento y es esencial para el desarrollo del sistema inmune intestinal. Esta interacción mantiene una dinámica específica del sistema inmune que se adapta a la flora bacteriana sin inducir inflamación. Por tanto, el reconocimiento entre la flora y los microorganismos patógenos puede ser esencial para la delicada homeostasis de la mucosa intestinal. Esta sensibilidad se mantiene por la capacidad de reconocimiento de los patrones microbianos específicos a través de los receptores de membrana denominados TLR, que inician una cascada de cinasas que produce una translocación de factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B que van desde el citoplasma hasta el núcleo y estimulan la producción de mediadores y citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 o IL-12. En humanos, los TLR más conocidos son TLR4, para lipopolisacáridos de bacterias gramnegativas, y TLR2, para los múltiples productos de bacterias grampositivas, microbacterias y levaduras. Estos receptores no sólo se expresan en células autoinmunes, también se expresan en el epitelio intestinal. La superficie del lumen del intestino está expuesta a bacterias gramnegativas, lo que debería de inducir la activación de los TLR y la liberación de cinasas mediadoras de

la inflamación, pero las células epiteliales expresan niveles bajos de este receptor para mantenerlos, al contrario de lo que ocurre con los enfermos de Crohn que tienen una sobreexpresión de estos receptores que provocan una reacción descontrolada antes las bacterias de la flora intestinal y con ello, un proceso inflamatorio. [4]

Por lo que volvemos a la introducción y a los inmunosupresores más utilizados, la azatioprina y la 6-mercaptopurina son fármacos que reducen las respuestas inmunitarias del cuerpo y pueden reducir la inflamación asociada con la enfermedad de Crohn. [5] ¿Reducirán estos fármacos la respuesta del sistema inmune actuando sobre lo citado anteriormente?

#### 4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA AZATIOPRINA

La azatioprina tiene numerosos mecanismos de acción, aunque se desconoce el principal por lo que se utiliza para esta enfermedad. Entre los mecanismos que se piensan principalmente, se encuentran la producción de 6-mercaptopurina que actúa como un antimetabolito de las purinas, bloqueo de grupos -SH mediante la adición de un grupo alquilo, inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos, la reducción de actividad celular por algunas coenzimas, el daño al DNA añadiendo tioanálogos purínicos. [6]

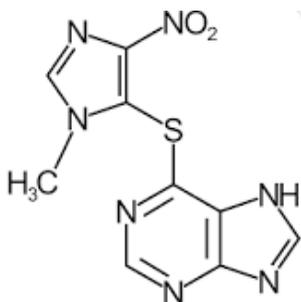


Figura 1. Estructura química de la azatioprina. [7]

#### 5. REACCIONES DE LA AZATIOPRINA

¿Qué reacciones sufre este inmunosupresor? La azatioprina es convertida a 6-mercaptopurina por un proceso no enzimático. Las transformaciones iniciales de 6-mercaptopurina ocurren por una ruta catabólica mediada por la xantina oxidasa, produciendo ácido 6-tiourico, tiopurin-metil-transferasa (TPMT) y anabólica mediante la hipoxantina fosforribosil-transferasa. Se produce 6-tioinosina-monofosfato (6-TGN) por la inosina-monofosfato deshidrogenasa o por metilación a 6-metilmercaptopurina ribonucleotido. Las transformaciones iniciales de 6-tioguanina (6-TG) ocurren por dos vías metabólicas competitivas. La vía anabólica convierte 6-TG directamente a 6-TGN. La vía competitiva catabólica (TPMT) produce concentraciones mínimas de nucleótidos metilados de tioguanina. Estos aumentos favorecen que los pacientes de esta enfermedad consigan una respuesta favorable a las semanas. [8]

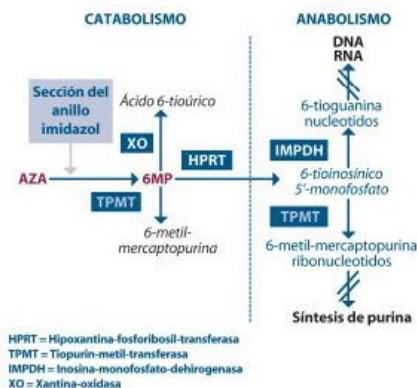


Figura 2. Esquema de las reacciones de la azatioprina. [8]

#### 6. CONCLUSIONES

Aunque los fármacos orales tienen buenos resultados, se ha demostrado que existen unos tratamientos biológicos que favorecen a la mejora de los pacientes haciendo uso de la combinación de inmunosupresores y de los biológicos. Uno de ellos es el ya citado, infliximab. El infliximab es un anticuerpo monoclonal que se une tanto a la forma soluble como a la transmembrana del TNF- $\alpha$ , infliximab inhibe la función de este, por lo que reduce la producción de los mediadores y citocinas como el TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 o IL-12, mediante la reducción de estos factores se evita que se desencadene la respuesta inflamatoria. [9]

#### 7. REFERENCIAS

- [1] Web de ASCRS American Society of Colon and Rectal Surgeons. <https://www.fascrs.org/patients/disease-condition/enfermedad-de-crohn>
- [2] Web de NIH National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/enfermedades-digestivas/enfermedad-crohn/diagnostico>
- [3] Web de Educainflamatoria. <https://www.educainflamatoria.com/inmunosupresores>
- [4] N.Borrue, Francisco Guarner, "Fisiopatología de la enfermedad de Crohn"
- [5] Web de Cochrane. <https://www.cochrane.org/es/CD000067/azatioprina-o-0-mercaptopurina-para-el-mantenimiento-de-la-remision-en-la-enfermedad-de-crohn>
- [6] Web de Vademecum. <https://www.iqb.es/cdbasicas/farma/farma04/a061>
- [7] Wikipedia. <https://es.wikipedia.org/wiki/Azatioprina>
- [8] Web de IntraMed. <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=44118>
- [9] <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/FICHAS%20TECNICAS%20POR%20FECHAS%20D%20ALTA%20PDF/1999-10%20PDF/Remicade.PDF>



**María Sánchez Ros.** Estudiante de cuarto curso del grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

# Medicamentos biológicos: biosimilares

Ana Gil López, Alicia Segura Mejías

**Resumen**—La creciente necesidad de nuevos fármacos para combatir las enfermedades, ha hecho que sea necesario buscar diferentes estrategias para poder desarrollarlos. El avance en el campo de la biotecnología ha permitido aplicar múltiples técnicas para conseguir nuevas alternativas terapéuticas. Entre ellas, cabe destacar los medicamentos biosimilares, cuyo interés se ha incrementado debido a las ventajas que presenta frente a su medicamento biológico de referencia.

**Palabras Claves**— Biológicos, Medicamentos, Biosimilares, Estrategias farmacológicas, Ensayos clínicos.

## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia se han utilizado multitud de estrategias farmacológicas para conseguir prevenir, mejorar o curar distintas patologías. Los avances en biología molecular, ingeniería genética y diferentes técnicas biotecnológicas, han permitido el desarrollo de nuevos medicamentos de origen biológico y biotecnológico, dando lugar a una alternativa terapéutica [1].

Cabe destacar a los medicamentos biológicos, los cuales han tenido una elevada tasa de crecimiento, llegando a suponer el 50% de los medicamentos que están en investigación clínica. Dentro de este grupo han surgido los biosimilares como una alternativa para solucionar uno de los inconvenientes de los medicamentos biológicos, los elevados costes, y además han posibilitado el aumento de la disponibilidad de tratamientos biológicos, aportando sostenibilidad y eficiencia a los sistemas sanitarios [2], [3].

## 2. MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS

Según la OMS, los medicamentos biológicos son aquellos obtenidos a partir de microorganismos, tejidos, cultivos celulares u otros fluidos de origen vegetal o animal [3].

Según el RD 1345/2007, de 11 de octubre, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente, se define como medicamento biológico el que tiene como principio activo una sustancia de origen biológica, siendo aquella que se extrae o produce a partir de una fuente biológica, y que necesita una serie de ensayos físico-químicos para determinar su calidad y caracterización, además del proceso de producción y control. El concepto de medicamento biológico incluye medicamentos biotecnológicos, inmunológicos, hemoderivados y terapia avanzada [1].

### 2.1. Medicamentos Biosimilares

Los medicamentos biosimilares son aquellos basados en un medicamento biológico de referencia ya aceptado y comercializado por la Unión Europea (UE). Es decir, medicamentos que una vez pasado el período de protección y expirado el período de exclusividad, se autorizan con una composición similar a un medicamento biológico de referencia, y cumple todos los requisitos necesarios para la autorización de comercialización [1], [4], [5].

Los biosimilares presentan diversas características, entre las que cabe mencionar su similitud con el medicamento de referencia, en lo que respecta a propiedades físicas, químicas, biológicas, y rendimiento clínico. Los medicamentos biosimilares presentan cierto grado de variabilidad intrínseca debido a que los organismos vivos son variables de forma natural. No se consideran medicamentos genéricos puesto que el proceso de fabricación implica mayor variabilidad intrínseca y más complejidad, no permitiendo una réplica exacta del medicamento de referencia, además es necesaria la existencia de un marco normativo específico para estos medicamentos [4], [6].

## 3. DESARROLLO DE MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS

El desarrollo de estos medicamentos es un proceso complejo y costoso. Y debido a la alta complejidad de trabajar con productos biológicos para la producción de fármacos, resulta necesaria la existencia de una estricta regulación [6].

El proceso de fabricación de medicamentos biológicos consta, generalmente, de dos grandes fases. Una primera denominada *upstream*, en la que se lleva a cabo la producción a pequeña escala, y una segunda fase, *downstream*, que es una fase de transformación y producción a gran escala (Figura 1) [1].

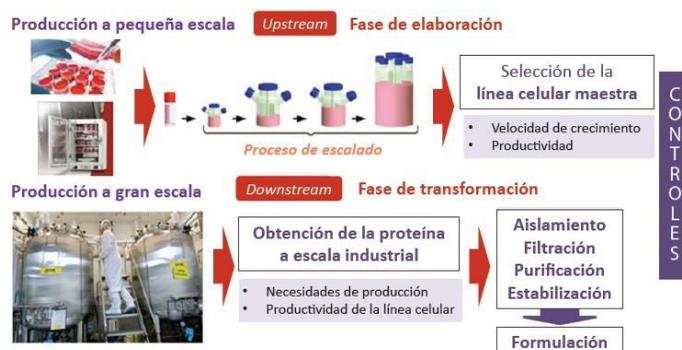


Fig. 1. Pasos fundamentales en el proceso de fabricación de un fármaco biológico [1].

### 3.1. Desarrollo de biosimilares

El proceso de producción de medicamentos biosimilares consiste en una serie de pasos prácticamente idénticos a los llevados a cabo en la producción del medicamento

biológico de referencia. La diferencia principal radica que en el caso de los biosimilares hay que establecer los criterios de biosimilitud. Es decir, fijar los atributos de calidad críticos con implicación relevante clínicamente (CQAs), para lo cual se aplican diferentes técnicas analíticas sobre un conjunto de productos de referencia. En esta caracterización, se evalúan atributos físicoquímicos y atributos funcionales, los cuales forman la “huella digital” de dicho producto [7], [8], [9].

Tras establecer estos criterios se procede al desarrollo del biosimilar que consta de cuatro etapas [9], [10], [11]:

- Etapa 1: Selección de la línea celular. Generalmente se utilizan líneas celulares del ovario de hámster chino, ya que pueden crecer en suspensión, presentan estabilidad frente a cambios de oxígeno y pH, tienen un elevado rendimiento específico y además, producen patrones de glicosilación similar al del humano. Se realiza un primer control de los CQAs verificándolos.
- Etapa 2: Cultivo celular y producción de la proteína. Del banco de células madre seleccionado, se descongela un vial, con el cual se va a llevar a cabo el proceso de expansión. Es importante no alterar las condiciones de cultivo, ya que eso conllevaría una modificación de los CQAs, por lo tanto, hay que monitorizar el proceso de producción.
- Etapa 3: Aislar y purificar la proteína diana. Para recuperar la proteína hay que filtrar y centrifugar para eliminar las posibles impurezas. Después se purifica mediante un proceso de cromatografía. Se verifican nuevamente los CQAs para asegurarse que el proceso de escalada no ha tenido impacto sobre estos.
- Etapa 4: Elección de la formulación más adecuada para la proteína que permita mantener la estabilidad de la misma. Posteriormente se realiza un proceso de llenado para dosificar en viales el producto obtenido. En esta etapa se realiza un tercer control de los CQAs para comparar la biosimilitud y confirmarla en cada lote [9], [10], [11].

Un aspecto clave en el desarrollo de biosimilares son los estudios de comparabilidad o biosimilaridad, para establecer la biosimilitud con el medicamento de referencia. Se trata de un proceso escalonado y específico de cada producto, para demostrar comparabilidad en términos de características, inmunogenicidad, calidad, actividad biológica, seguridad y eficacia. Se compone de forma general de tres pasos (Figura 2) [3], [6].



Fig. 2. Estudios de comparabilidad de un medicamento biosimilar y el medicamento de referencia [6].

Así mismo, un aspecto destacable es el hecho de que estos medicamentos tan sólo constan de fase I y fase III en los ensayos clínicos, a diferencia de los medicamentos de síntesis química que conllevan cuatro fases [9], [12].

#### 4. SEGURIDAD DE BIOSIMILARES

Los fármacos biológicos pueden producir efectos adversos debido a la complejidad de su estructura y su naturaleza biológica. Es por ello, que este tipo de medicamentos precisan de un seguimiento individualizado [3]. En cuanto a los efectos adversos de los medicamentos biológicos, estos presentan un perfil diferente al de otros medicamentos de síntesis química [1].

En los biosimilares el control de seguridad debe cumplir los mismos requisitos que para los medicamentos biológicos. Las reacciones adversas medicamentosas producidas, se pueden predecir teniendo en cuenta la acción farmacológica y conociendo el perfil del medicamento de referencia [6]. Los estudios de comparabilidad sugieren que la probabilidad del riesgo de eventos adversos graves o nuevos, es menor que la del agente biológico [3], [6].

Los requisitos de farmacovigilancia para biosimilares incluyen seguimiento adicional post-comercialización, la presencia de un triángulo negro invertido en el envase y un Plan de Gestión de Riesgos (PGR). Todos los medicamentos que requieren un seguimiento adicional llevan un triángulo invertido negro, para indicar que están sujetos a una especial vigilancia de su seguridad. Por otro lado, el PGR tiene como fin establecer el perfil de seguridad mediante la identificación de posibles riesgos y la propuesta de unas medidas para minimizarlos. Este proceso de seguimiento adicional tiene una duración mínima de cinco años, aunque puede retirarse antes si así lo decide el Comité de evaluación de riesgos de farmacovigilancia (PRAC) [1].

Otra cuestión a destacar de la seguridad de los biosimilares es la trazabilidad, para lo cual deben tener un nombre comercial y un número de lote identificativos, permitiendo el seguimiento del medicamento desde que se comercializa hasta que llega al paciente [1], [6].

La inmunogenicidad hay que considerarla debido a la capacidad intrínseca de los biosimilares de producir una respuesta inmunitaria no deseada, que en pocas situaciones, conlleva una reducción de la eficacia o una reacción adversa [6].

#### 5. BIOSIMILARES APROBADOS

En el 2006 se aprobaba el primer medicamento biosimilar por la UE, la somatotropina, una hormona de crecimiento obtenida mediante tecnología recombinante, para el tratamiento del enanismo, síndrome de Prader-Willi y síndrome de Turner. A partir de esa fecha han sido muchos los medicamentos biosimilares aprobados. Actualmente en la EMA (Agencia Europea del medicamento) existen 67 medicamentos biológicos de 17 principios activos [6], [13]. En la AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) existen autorizados 42 medicamentos de 15 principios activos [13], [14], [15] (Tabla 1).

TABLA 1  
BIOSIMILARES APROBADOS POR LA AEMPS [14], [15], [16].

Principio activo	Nombre comercial	Indicación terapéutica
Adalimumab	Amgevita®	Patologías artríticas y psorásicas, Enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa, Uveítis
	Hyrimoz®	
	Hulio®	
	Idacio®	
Condroitina sulfato sodio	Imraldi®	Artrosis
	Cerise®	
	Condroitin sulfato®	
	Condrosan®	
Enoxaparina sódica	Crusia	Trombosis venosa
	Enoxaparina Rovi®	
	Hepaxane®	
Epoetina alfa	Inhixa®	Anemia secundaria a procesos oncológicos, IR terminal
	Binocrit®	
Epoetina zeta	Retacrit®	Anemia secundaria a procesos oncológicos, IR terminal
Etanercept	Benepali®	AP, AR, Psoriasis en placa, Espondilitis anquilosante
	Erelzi®	
Filgastrim	Accofil®	Neutropenia en procesos oncológicos, Trasplante de precursores hematopoyéticos
	Nivestim®	
	Ratigastim®	
	Tevagrastrim®	
	Zarzio®	
Folitropina alfa	Bemfola®	Anovulación
	Ovaleap®	
Infliximab	Flixabi®	AP, AR, Psoriasis, Colitis ulcerosa, Enfermedad de Crohn, Espondilitis anquilosante
	Inflectra®	
	Remsina®	
	Zessly®	
Insulina glargina	Abasaglar®	Diabetes Mellitus
Pegfilgastrim	Pelgraz®	Neutropenia
	Pelmeg®	
	Ziextenso®	
Rituximab	Rixathon®	Granulomatosis de Wegenes, Poliangeítis microscópica, Linfoma no Hodgkin, LLC de células B, AR
	Riximyo®	
	Truxima®	
Somatropina	Omnitrope®	Enanismo, Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Turner
Trastuzumab	Herzuma®	Cáncer de mama, Cáncer de estómago
	Kanjinti®	
	Ogivri®	
	Ontruzant®	
	Trazimera®	
Teriparatida	Movymia®	Osteoporosis
	Terrosa®	

Tabla adaptada del Anexo II de la Guía de Biosimilares de la EMA. IR: Insuficiencia Renal. AR: Artritis Reumatoide. AP: Artritis Psoriásica. LLC: Leucemia Linfocítica Crónica. Última revisión 05/06/2020.

## 6. CONCLUSIONES

Los medicamentos biológicos y en particular los biosimilares, han supuesto una nueva ventana terapéutica para enfermedades que no tenían un tratamiento bien definido. Así pues, los biosimilares han permitido ampliar el uso de fármacos biológicos, ya que han proporcionado alternativas efectivas, seguras y menos costosas en comparación con los productos biológicos. Son muchos los medicamentos biosimilares aprobados hasta el momento, pero resulta necesario y de gran interés seguir investigando en este sentido, para ampliar las opciones y aprovechar las ventajas que ofrece esta estrategia terapéutica.

## REFERENCIAS

[1] *Medicamentos biológicos: innovadores y biosimilares*. Madrid, Espa-

- ña. Consejo General del Colegio Oficial de Farmacéuticos. 2019.
- [2] J.L. Poveda, V. Bosó. "Medicamentos biosimilares: la visión desde la farmacia hospitalaria". *Libro blanco de los medicamentos biosimilares en España: calidad sostenible*. Fundación Gaspar Casal, eds. Madrid, España: Sandoz, pp 213- 232.
- [3] González-Andrade F., eds. *Medicamentos biológicos: presente y futuro de la terapéutica*. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador, 2017.
- [4] F. De Mora, "Biosimilar: what it is not". *Br J Clin Pharmacol*. Vol. 80, no. 5, pp. 949-956, Nov. 2015. Doi: 10.1111/bcp.12656.
- [5] D. R. Cumplido and C. A. Ostos. "Fármacos biológicos y biosimilares: aclarando conceptos". *Aten Primaria*, Vol. 50, no. 6, pp. 323-324, Jun-Jul 2018. Doi: 10.1016/j.aprim.2018.01.002.
- [6] *Los biosimilares en la UE. Guía informativa para profesionales sanitarios*. Agencia Europea del Medicamento y Comisión Europea, eds. 2019.
- [7] A.G. Vulto, O.A. Jaquez. "The process defines the product: what really matters in biosimilar design and production?" *Rheumatology*, Vol. 56, no. 4, pp. 14-29. Ags 2017. Doi: 10.1093/rheumatology/kex278.
- [8] Web mABxience. <https://www.mabxience.com/es/>.
- [9] Web AMGEN Biosimilars. <https://www.amgenbiosimilars.com/>.
- [10] J. Dumont, D. Euwart, B. Mei, S. Estes, and R. Kshirsagar. "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status and future perspectives". *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 36, no. 6, pp. 1110-1122, Feb-Sept 2015. Doi: 10.3109/07388551.2015.1084266.
- [11] F. Li, N. Vijayasankaran, A. She, R. Kiss, and A. Amanullah. "Cell culture processes for monoclonal antibody production". *mAbs*, Vol. 2, no. 5, pp. 466-479, Jul-Sep 2010. Doi: 10.4161/mabs.2.5.12720.
- [12] D. Levêque. "Médicaments biosimilaires en oncologie". *Bull-Cancer*, Vol. 103, no. 3, pp. 294-298, March 2016. Doi: 10.1016/j.bulcan.2015.12.004.
- [13] Web de la EMA, Agencia Europea del Medicamento. <https://www.ema.europa.eu/en/>.
- [14] *Guía de los medicamentos biosimilares para farmacéuticos*. Asociación Española de Biosimilares. Madrid, Ener, 2019.
- [15] Web de la AEMPS, Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. <https://cima.aemps.es/>.
- [16] Web BIOSIM, Asociación Española de Biosimilares. <https://www.biosim.es/>.



**Ana Gil López.** Graduada en Farmacia por la Universidad de Salamanca (2010-2015). Actualmente, cursando el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria en el itinerario Nuevos Fármacos de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

**Alicia Segura Mejias.** Graduada en Biología por la Universidad de Sevilla (2014-2019). Actualmente, cursando el primer curso del Máster en Biotecnología Sanitaria en el itinerario Nuevos Fármacos de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).



# La enfermedad de Gaucher: características clínicas y tratamientos

Miguel Salazar-Martínez

**Resumen**—La enfermedad de Gaucher es una enfermedad rara lisosomal y hereditaria que afecta a 1 de cada 60.000 personas, pudiendo incrementar su incidencia en ciertas razas como los judíos de origen Ashkenazi. La investigación ha permitido, además de determinar las características clínicas de la enfermedad, establecer una serie de tratamientos para ciertas afecciones de la misma. Sin embargo, sumado a la dificultad para encontrar tratamiento para cada uno de los síntomas, y en especial los neuropáticos, existe la dificultad de reclutar pacientes en un número elevado, así como con un diagnóstico correcto, lo que hace que por razones económicas los grandes fabricantes farmacéuticos no lleven a cabo el desarrollo y comercialización de fármacos para tratar la enfermedad, haciendo que la mayoría de estos se designen como huérfanos. En este artículo, junto a las características clínicas de la enfermedad de Gaucher, se describen las terapias actualmente en vigor para el tratamiento de la misma, así como algunas investigaciones prometedoras en este campo.

**Palabras Claves**—Enfermedad de Gaucher, Enfermedad lisosomal, Enfermedad rara, Fármaco, Tratamiento.

## 1. INTRODUCCIÓN

Descrita por primera vez en 1882 por el dermatólogo francés Phillipe C. E. Gaucher, la enfermedad de Gaucher es un trastorno hereditario [1], [2] que, según la base de datos Orphanet, se define como una enfermedad de depósito lisosomal comprendiendo tres tipos principales, una forma fetal y una variante con afectación cardiovascular [3].

La enfermedad es causada por un error congénito del metabolismo que afecta a muchos de los órganos y tejidos del cuerpo. Tiene su origen en un defecto en la biogénesis de la enzima hidrolasa lisosomal  $\beta$ -glucocerebrosidasa a nivel del gen que la codifica, GBA (en casos extremadamente poco frecuentes la enfermedad se produce por un déficit de saposina C, el activador fisiológico de dicha enzima) [1], [4], [5]. La glucocerebrosidasa se encarga de degradar lípidos complejos como son los glucoesfingolípidos, entre los cuales se encuentran los glucocerebrósidos (también denominados glucosilceramidas), componentes esenciales de las membranas celulares de las células rojas y leucocitarias.

Los hematíes y los leucocitos son destruidos cada 20-30 días, y los componentes químicos de sus membranas son liberados para ser eliminados o reutilizados [4]. La  $\beta$ -glucocerebrosidasa cataliza la hidrólisis del enlace  $\beta$ -glucosídico de los glucocerebrósidos, por lo que la ausencia o la baja actividad de esta enzima provocará la acumulación anormal y en exceso del glucoesfingolípido no degradado. En individuos sanos, la enzima descompone el glucocerebrósido en los lisosomas de las células del linaje de los monocitos y macrófagos, teniendo entonces lugar el acúmulo lipídico principalmente en los lisosomas de los macrófagos del sistema reticuloendotelial [1].

Por lo tanto, la manifestación clínica del trastorno será mayor en aquellos órganos ricos en dichos macrófagos, principalmente en vísceras como el bazo, el hígado, o el pulmón, y también en la médula ósea, huesos y sistema nervioso central, en los cuales se encontrarán las denominadas células de Gaucher (Fig. 1), que no son más que los macrófagos grandes y espumosos cuyos lisosomas están cargados inapropiadamente de los glucocerebrósidos no degradados [5].

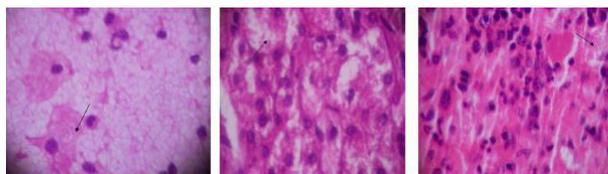


Fig. 1. De izquierda a derecha, fotografías de células de Gaucher repletas de glucocerebrósidos en bazo, hígado y médula ósea. Extraídas de Millán Batista *et al.*, 2007 [6].

Cuando los glucocerebrósidos son embebidos por las células del sistema reticuloendotelial y almacenados en los lisosomas, lo hacen como estructuras microtubulares, estos túbulos interfieren con la muerte celular programada confiriendo a la célula un relativo grado de inmortalidad [4]. Es por ello que estas células de Gaucher perduran indefinidamente en el organismo, acumulándose progresivamente y aumentando el tamaño los órganos en las que se localizan, lo que inhibe el funcionamiento normal de los mismos pudiendo llevar a originar disfunción orgánica, así como a motivar que se desencadene un proceso inflamatorio mediante la acción de las interleucinas 6 y 10 y el factor de necrosis tumoral, que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad [5], [7].

El patrón de herencia para las distintas formas de la enfermedad es autosómico recesivo, es decir, para padecerla, la mutación en el gen debe darse en estado de homo-

cigosis, los trastornos genéticos ocurrirán cuando un individuo herede un gen anormal de cada progenitor, siendo el riesgo idéntico para hombres y para mujeres [8]. Hasta la fecha se han identificado más de 300 alelos mutantes originados a partir de deleciones, inserciones, alelos recombinantes, etc. los cuales disminuyen total o parcialmente la actividad catalítica de la enzima [4]. Algunos se presentan con mayor frecuencia: la mutación de cambio de sentido N370S es la más frecuente en los pacientes tipo I, la L444P consistente en un cambio de aminoácido está asociada a síntomas neurológicos típicos de los tipos II y III, al igual que la mutación IVS2, entre otras [4], [9], [10], [11].

## 2. CUADRO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Gaucher son muy heterogéneas, existiendo individuos que la padecen prácticamente asintomáticos, así como aquellos que pueden llegar a mostrar síntomas normalmente multisistémicos y usualmente debilitantes, discapacitantes, e incluso deformantes, lo que puede conllevar su muerte. Los órganos en los que tiene lugar la acumulación de las células de Gaucher inicialmente siguen cumpliendo sus funciones con normalidad, pero el acúmulo del producto no digerido provoca ciertos síntomas [9], [11].

Se conoce que la intensidad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad no se correlaciona estrechamente con el nivel de actividad enzimática, ni tampoco con la mutación concreta presente en el paciente enfermo, sino más bien por una interacción de múltiples factores como la cantidad residual de enzima, el genotipo, factores ambientales, etc. [1]. Es por ello que, a pesar del grado de heterogeneidad fenotípica, la enfermedad puede clasificarse en tres tipos principales según la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas neurológicas y la gravedad de las mismas [12].

### 2.1. Tipo I o no neuropático

Es la forma más común en occidente, y compatible con una supervivencia prolongada, ya que no existen trastornos del sistema nervioso central. La edad de inicio de la enfermedad y la gravedad de los síntomas son muy variables, pudiendo manifestarse de forma temprana en la infancia o ya en la vejez. Algunos pacientes con la enfermedad de Gaucher tipo I carecen de síntomas representativos, mientras que otros pueden desarrollar afecciones viscerales, hematológicas y/o esqueléticas asociadas con hepatoesplenomegalia, anemia de intensidad variable, leucopenia, trombocitopenia, osteoporosis o crisis óseas. Raras son las afecciones pulmonares, renales y cardíacas [6], [8], [9], [10], [11], [12].

### 2.2. Tipo II o neuropático agudo

Aunque es la variante clínica más infrecuente, tiene una forma de presentación más grave, pues, además de los signos descritos para el tipo I (exceptuando la afectación ósea), implica alteraciones neurológicas desde el nacimiento y un deterioro cerebral progresivo que empeora

rápidamente [9]. No es tratable debido a dicho daño cerebral grave e irreversible que causa la muerte generalmente antes de los dos años de edad [2], [13].

### 2.3. Tipo III o neuropático subagudo o crónico

Puede ser el tipo más común en todo el mundo. Suele darse en pacientes jóvenes con las afectaciones características del tipo I más la afectación progresiva del sistema nervioso central característica del tipo II, pero de forma menos grave, teniendo un inicio posterior y más gradual en comparación con el tipo II (algunos pacientes fueron diagnosticados de enfermedad de Gaucher en su infancia y desarrollaron las alteraciones neurológicas en la edad adulta) [6]. Las personas que la padecen, con el tratamiento adecuado, pueden sobrevivir hasta la edad adulta con una amplia variedad de signos y síntomas: pueden padecer o no hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia, alteraciones esqueléticas, valvulopatía mitral y/o aórtica, parálisis supranuclear, apraxia oculomotora, hipertensión pulmonar, etc. Se manifiestan de forma generalizada crisis convulsivas, mioclonías, retraso del crecimiento y pobre ganancia de peso, estrabismo, entre otras. Sin tratamiento, los afectados mueren por complicaciones derivadas de estos síntomas [13].

Además de las variantes clásicas, se reconocen variantes clínicas infrecuentes como la forma letal perinatal o la variante cardiovascular, la primera se produce por complicaciones graves y potencialmente mortales que comienzan antes del nacimiento, incluyendo hidropesía fetal. La supervivencia es de unos días tras el nacimiento. La variante cardiovascular principalmente afecta al corazón, provocando que las válvulas cardíacas se calcifiquen y, en consecuencia, se endurezcan [2].

## 3. TRATAMIENTOS

Hasta hace algunos años el tratamiento de la enfermedad de Gaucher era exclusivamente sintomático, sin influencia en el pronóstico [4]. Sin embargo, en la actualidad hay tratamientos farmacológicos que permiten modificar el fenotipo de la enfermedad y mejorar la salud general en el caso del tipo I y del tipo III, sin tener en cuenta la afectación cerebral de este último.

### 3.1. Terapia de reemplazo enzimático

Se basa en equilibrar, mediante réplicas funcionales de la enzima natural, obtenidas por diferentes métodos, los niveles de enzima glucocerebrosidasa deficientes en los pacientes Gaucher para que estos puedan descomponer los glucocerebrósidos. Funciona bien para controlar las complicaciones derivadas de Gaucher tipo I y III, sin embargo, la enzima de reemplazo no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que tiene poco efecto sobre la afectación cerebral grave de los tipos II y III de la enfermedad [14].

La primera enzima empleada para el tratamiento de la enfermedad fue la alglucerasa obtenida de tejido placentario humano (bajo el nombre del medicamento huérfano

Ceredase), sin embargo, las limitaciones de obtención de la misma llevaron a que años más tarde se desarrollase una forma recombinante de la enzima, la imiglucerasa (Cerezyme), obtenida mediante manipulación genética de células de ovario de hámster chino (células CHO). Otros medicamentos aprobados incluyen velaglucerasa alfa (VPRIV) producida en una línea celular humana continua y taliglucerasa (Elelyso), producida en células de zanahoria genéticamente modificadas [15].

Como resultado de la terapia, disminuye la acumulación de glucocerebrósidos y se revierten o detienen ciertas manifestaciones clínicas de la enfermedad: hay una mejora de las manifestaciones viscerales y hematológicas con una reducción del tamaño del bazo y del hígado y una corrección de la anemia y trombocitopenia, así como una reducción del dolor y las crisis óseas [4], [15]. El hecho de que tenga que ser administrada por vía intravenosa periódicamente, la aparición de anticuerpos no neutralizantes frente a ella y su poco efecto directo sobre las manifestaciones neurológicas debido a su incapacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, así como su alto costo, generan ciertos inconvenientes.

### 3.2. Terapia de reducción del sustrato

Surge como una terapia oral para el tratamiento de pacientes adultos con enfermedad de Gaucher leve a moderada tipo I, en el caso de que la terapia de reemplazo enzimático no sea una opción [14].

Se basa en la inhibición parcial de la enzima ceramida-glucosiltransferasa que cataliza la biosíntesis de glucosilceramida, lo que se traduce en una disminución del sustrato acumulado con la consecuente mejora de las manifestaciones clínicas [15]. Uno de los medicamentos utilizados, bajo el nombre de Zavesca, es una molécula análoga de la glucosa, miglustat (Fig. 2), que inhibe reversiblemente la enzima mencionada. Este tratamiento permite mejorar la organomegalia, la densidad ósea y los parámetros hematológicos de los pacientes Gaucher, sin embargo, al inhibir otras enzimas intestinales glucosidasas puede causar efectos adversos gastrointestinales. Se ha demostrado que atraviesa en parte la barrera hematoencefálica. Un análogo de la ceramida, eliglustat (Fig. 2), es utilizado como medicamento bajo el nombre Cerdelga, inhibiendo también a la enzima ceramida-glucosiltransferasa y mostrando mejoría de los parámetros hematológicos, volúmenes viscerales y una reducción de los problemas óseos. Ambos medicamentos muestran efectos secundarios leves [15].

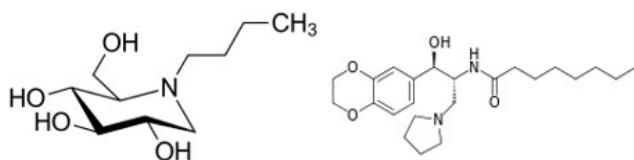


Fig. 2. Estructura química del miglustat (izquierda) y del eliglustat (derecha) [16], [17].

### 3.3. Otras terapias más novedosas

Al planteamiento terapéutico de la enfermedad de Gaucher de disminuir la síntesis de glucocerebrósido a través de la inhibición de la enzima ceramida-glucosiltransferasa o aumentar la degradación mediante perfusión periódica de  $\beta$ -glucocerebrosidasa recombinante puede añadirse un tercer método: recuperar la actividad residual de las enzimas defectuosas mediante chaperonas farmacológicas.

Las chaperonas son un tipo de proteína involucradas en el plegamiento de otras proteínas. Para una enzima mutada, como es el caso de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa en la enfermedad de Gaucher, la secuencia anormal de aminoácidos puede provocar que las chaperonas no la plieguen de forma adecuada, siendo degradada la proteína mal plegada en el proteosoma. Es por ello que el uso de compuestos químicos implementados vía oral que actúen como chaperonas y permitan el plegamiento específico de las proteínas mutadas es interesante para evitar su degradación, y permitir que la enzima llegue de forma activa a los lisosomas. Para el caso de la enfermedad de Gaucher se ha probado el iminoazúcar isofagomina, aunque fármacos ya aprobados para otras afecciones están estudiándose para su uso como chaperonas farmacológicas [9], [15].

En la búsqueda de moléculas que podrían optimizarse para la penetración en el sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica se ha identificado el tamoxifeno a partir de un cribado en fibroblastos derivados de pacientes tipo II, en los que esta molécula revirtió modestamente el fenotipo de la enfermedad [18]. Además, como alternativa terapéutica a la farmacológica, en pacientes con enfermedad neurológica puede realizarse un trasplante de médula ósea como forma de aporte enzimático, siendo un tratamiento de alto riesgo pero que implica curación cuando es exitoso [1].

Por su parte, la nanotecnología puede proporcionar portadores útiles para proteger y preservar con éxito las enzimas y transportarlas a través de la barrera hematoencefálica hacia ubicaciones cerebrales. Varias estrategias basadas en atacar receptores específicos de la barrera han llevado a nanopartículas a transportar con éxito moléculas al cerebro [19].

## 4. CONCLUSIONES

Pese a haberse logrado avances considerables en el conocimiento de la enfermedad de Gaucher, la complejidad de la misma, principalmente en lo que a efectos neurológicos se refiere, hace que aún se resientan los tratamientos para los tipos más graves de la enfermedad: II y III. La dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica es un hecho a la luz de los resultados hallados para los diversos tratamientos propuestos.

Este hándicap, sumado a los efectos secundarios que surgen del empleo de las terapias de reemplazo enzimático y reducción del sustrato en algunos pacientes hace que sea

aún más necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos que permitan tratar todo el rango de afecciones que presenta la enfermedad. Para ello, y pese a la labor altruista de asociaciones de pacientes con enfermedades raras, sería de utilidad contar con capital de empresas farmacéuticas, que permitiese seguir adelante con la investigación, contando con que las últimas llevadas a cabo como la propuesta acerca del uso de chaperonas farmacológicas, tamoxifeno e incluso la nanotecnología han permitido obtener tan buenos resultados incluso para los tipos más graves de la enfermedad.

Una perspectiva futura de interés podría ser estudiar suplir el gen que codifica la enzima, en lugar de reemplazar a esta. En definitiva, es vital continuar con los estudios sobre Gaucher y permitir afianzar y ampliar los conocimientos actuales que se tienen sobre la enfermedad, con el objetivo de lograr un tratamiento completo en un futuro lo más cercano posible.

## REFERENCIAS

- [1] González Jiménez, E., Aguilar Cordero, M.J., Álvarez Ferre, J., and García López, P.A., "Enfermedad de Gaucher y su manejo clínico en el paciente pediátrico", *Revista clínica de medicina de familia*, vol. 3, no. 2, pp. 114-120, 2010.
- [2] Web del National Institutes of Health, entrada "Your Guide to Understanding Genetic Conditions: Gaucher disease". <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/gaucher-disease#>
- [3] Web de Orphanet, entrada "Enfermedad de Gaucher". [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?lng=ES&Expert=355](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=355)
- [4] Llorca, I.L., and Noguera, O.V., "Enfermedad de Gaucher: a propósito de un caso", *Revista de Diagnóstico Biológico*, vol. 51, no. 3, pp. 100-104, 2002.
- [5] Giraldo, P., Giralto, M., Pérez-Calvo, J.I., Pocoví, M., Roca, M., and Rubio-Feliu, D. "Enfermedad de Gaucher", *Editorial Ibarгүйen SC*, pp. 57-95, 2004.
- [6] Millán Batista, R., Patiño Pérez, J.M., Matos Pérez, M.J., Pupo, S., Julia, N., and Reyes González, O., "Enfermedad de Gaucher tipo 1. Presentación de caso", *Correo Científico Médico de Holguín*, vol. 21, no. 3, pp. 924-931, 2017.
- [7] Mozafari, H., Khatami, S., Kiani, A., Rahimi, Z., Vaisi-Raygani, A., Afsharnaderi, A., and Alaei, M.R., "Oxidative Stress Parameters, Trace Elements, and Lipid Profile in Iranian Patients with Gaucher Disease", *Biological trace element research*, vol. 193, no. 1, pp. 130-137, 2020, doi: 10.1007/s12011-019-01709-3
- [8] Web de la Fundación Española para el Estudio y Tratamiento de la Enfermedad de Gaucher y otras Lisosomales (FEETEG). Entrada "Enfermedad de Gaucher". [http://www.feeteg.org/G\\_conocer.php](http://www.feeteg.org/G_conocer.php)
- [9] Lavaut Sánchez, K., Núñez Quintana, A., Nordet Carreras, I., González Otero, A., Svarch, E., Machín García, S., Giraldo, P., and Sá Miranda, C., "Aspectos clínicos, bioquímicos, moleculares y tratamiento de 2 pacientes con enfermedad de Gaucher", *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, vol. 26, no. 1, pp. 54-61, 2010
- [10] de Machín, A.M. "Enfermedad de Gaucher Tipo I y embarazo: diagnóstico molecular", *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, vol. 74, no. 3, 2014.
- [11] Aerts, J.M., Kuo, C.L., Lelieveld, L.T., Boer, D.E., van der Lienden, M.J., Overkleeft, H.S., and Artola, M., "Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease", *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 53, pp. 204-215, 2019, doi: 10.1016/j.cbpa.2019.10.006
- [12] Lozano Bernal, J.E., "Gaucher's disease: Casuistic from Tolima", *Acta Médica Colombiana*, vol. 31, no. 4, pp. 416-421, 2006.
- [13] Drelichman, G., Basack, N., and Fernandez, N., "Consenso para la Enfermedad de Gaucher: grupo argentino de diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Gaucher", *Hematología*, vol. 17(Supl), 2013.
- [14] Web de la National Gaucher Foundation. Entrada "What Is Gaucher Disease?". <https://www.gaucherdisease.org/about-gaucher-disease/what-is/>
- [15] Pocoví, M., "Bases moleculares del tratamiento en la enfermedad de Gaucher", *Medicina Clínica*, vol. 137, pp. 32-38, 2011, doi:10.1016/S0025-7753(11)70014-8
- [16] Web de Wikipedia. Entrada "Miglustat". <https://en.wikipedia.org/wiki/Miglustat>
- [17] Web de Wikipedia. Entrada "Eliglustat". <https://en.wikipedia.org/wiki/Eliglustat>
- [18] Childers, W., Fan, R., Martinez, R., Colussi, D.J., Melenski, E., Liu, Y., Gordon, J., Abou-Gharbia, M. and Jacobson, M. A., "Novel compounds that reverse the disease phenotype in Type 2 Gaucher disease patient-derived cells". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 30, no. 2, pp. 126806, 2020, doi:10.1016/j.bmcl.2019.126806
- [19] Martin-Banderas, L., Holgado, M.A., Duran-Lobato, M., Infante, J.J., and Fernández-Arévalo, M., "Role of nanotechnology for enzyme replacement therapy in lysosomal diseases. A focus on Gaucher's disease", *Current medicinal chemistry*, vol. 23, no. 9, pp. 929-952, 2016, doi:10.2174/0929867323666160210130608



**Miguel Salazar-Martínez**, graduado en Biotecnología por la Universidad de Almería en 2019, cursa actualmente la modalidad de Nuevos Fármacos del Máster en Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

# IA aplicada al entrenamiento de jugadores de eSports

Daniel Emilio Luque López

**Resumen**—Introducción a los distintos lenguajes y algoritmos para implementar una IA capaz de “entrenar” a jugadores de eSports.

**Palabras Claves**—IA, entrenamiento, videjuegos, eSports, machine learning.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hace más de medio siglo (más concretamente, desde 1956), el ser humano concibió por primera vez el término “**inteligencia artificial**”, más conocido como “**IA**”, que se define como una rama de las ciencias de la computación que pretende o es requerida para la síntesis de procesos tales como la resolución de problemas, toma de decisiones, la adaptación del medio ambiente, el aprendizaje y la comunicación que se encuentran en los seres humanos y los animales. [1]

Y desde hace bien poco, los videdjuego se han hecho un hueco entre los deportes más convencionales y han adoptado nombre propio, los “eSports” o también llamados “deportes electrónicos”.

## 2. APRENDIZAJE AUTOMÁTICO COMO “MÉTODO DE APRENDIZAJE”

### 2.1. Necesidad de mejora

Los eSports, como cualquier deporte, tienen una serie de equipos, formados por una serie de jugadores cada uno. Estos entrenan, cada día, durante una serie de horas, para mejorar sus mecánicas dentro del juego, que sería el equivalente al entrenamiento de los equipos en otro tipo de deportes. Para ello, organizan partidas, llamadas “screams”, ya sea contra otros equipos (de la misma categoría, superior o inferior), o entre miembros del mismo equipo, con el objetivo de practicar nuevas estrategias, mejorar su visión de juego y otros factores que puedan ser importantes en sus partidas competitivas. Con el paso del tiempo, estos jugadores obtienen una mejora significativa a medida que van entrenando, aunque llega el momento de querer subir la intensidad dentro del entrenamiento y ahí es donde entra en juego la IA. Con la ayuda de esta tecnología, haremos que cada jugador pueda enfrentarse a una versión mejorada de sí mismo, con el objetivo de aumentar ese grado de dificultad dentro del entrenamiento.

## 3. MACHINE LEARNING

Es un subcampo de las ciencias de la computación y una rama de la inteligencia artificial, que tiene como objetivo desarrollar técnicas que permitan a las computadoras aprender, es decir, que el desempeño mejora con la experiencia.[1]

### 3.2. Tipos de algoritmos

Los diferentes tipos de algoritmos se clasifican en función de la salida de los mismo.

### 3.3. Aprendizaje supervisado

- La primera modalidad de aprendizaje que tiene el *machine learning* es la de aprendizaje supervisado. Usándola, se entrena al algoritmo otorgándole las preguntas, denominadas *características*, y las respuestas, denominadas *etiquetas*. Esto se hace con la finalidad de que el algoritmo las combine y pueda hacer predicciones. [2]

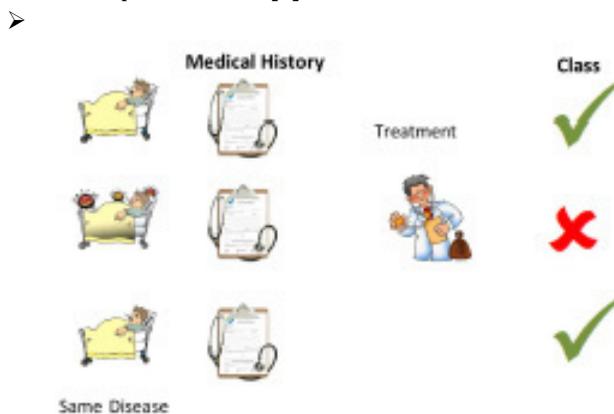


Fig. 1. Aprendizaje supervisado.[5]

### 3.4. Aprendizaje no supervisado

- A diferencia del aprendizaje supervisado, en el no supervisado solo se le otorgan las características, sin proporcionarle al algoritmo ninguna etiqueta. Su función es la **agrupación**, por lo que el algoritmo debería catalogar por similitud y poder crear grupos, sin tener la capacidad de definir cómo es cada individualidad de cada uno de los integrantes del grupo.[2]

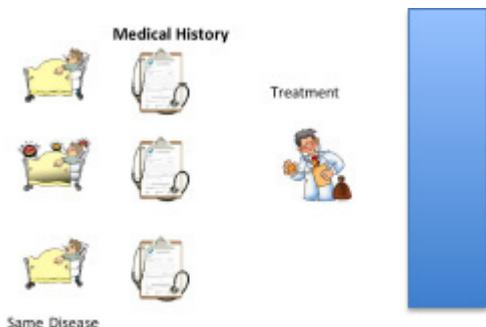


Fig. 2. Aprendizaje no supervisado.[5]

### 3.4. Aprendizaje semisupervisado

- Este tipo de algoritmos combinan los dos algoritmos anteriores para poder clasificar de manera adecuada. Se tiene en cuenta los datos marcados y los no marcados.[1]

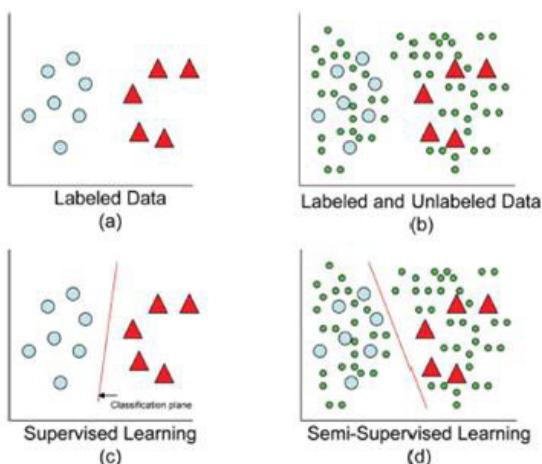


Fig. 3. Aprendizaje semisupervisado.[5]

### 3.4. Aprendizaje por refuerzo

- Se basa en que un algoritmo intenta determinar el mejor comportamiento del agente (la IA que estamos implementando) para obtener algún tipo de recompensa basada en la interacción con el medio en el que estemos. Por *medio* se entiende el entorno donde se desenvuelve el agente: puede ser un videojuego, un simulador, el mundo real, etc. [3]

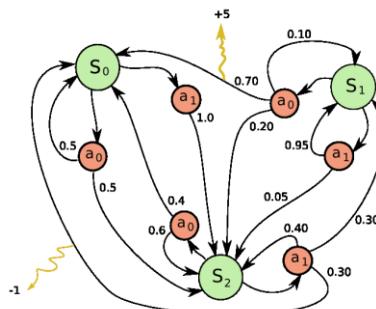


Fig. 4. Aprendizaje por refuerzo (Pocos de decisión de Markov).[5]

### 3.4. Aprendizaje multi-tarea

- Métodos de aprendizaje que usan conocimiento previamente aprendido por el sistema de cara a enfrentarse a problemas parecidos a los ya vistos. [1]

## 4. LENGUAJES DE PROGRAMACIÓN

Aunque existen infinidad de herramientas para este fin, veremos los lenguajes de programación para IA más recomendados. Si estás interesado en llevar a cabo un proyecto de automatización o de Machine Learning te aconsejamos dar uso de los siguientes lenguajes, puesto que te facilitarán la tarea. [4]

### 4.1. PYTHON

- Python es uno de los lenguajes más utilizados para configurar IA. Su simplicidad y las filosofías DRY (Don't Repeat Yourself) y RAD (Rapid Application Development) en las que se basa lo convierten en un candidato ideal. Puede utilizarse tanto para estructurar datos como para generar algoritmos de IA. Además, dispone de un catálogo de librerías muy extenso que permite hacer realidad cualquier tipo de Proyecto. [4]

### 4.2. R

- R dispone de paquetes de programación muy numerosos. Algunos de ellos se utilizan en el ámbito del Machine Learning, como RODBC. Para garantizar la funcionalidad de la IA, implementan algoritmos de aprendizaje automático. Se trata de uno de los mejores lenguajes para analizar y tratar con datos. Por ello, es posible crear buenas IA con finalidades estadísticas. [4]

### 4.3. LISP

- Lisp trabaja con expresiones simbólicas y prototipado, herramientas útiles en el campo del Machine Learning. Además, se utiliza en proyectos como CYC, cuyo objetivo es permitir a las aplicaciones basadas en IA ejecutar razonamientos similares a los humanos. [4]

### 4.4. PROLOG

- Se trata de un lenguaje de referencia en el entorno de la ingeniería. Una de sus funcionalidades más destacadas es que permite automatizar el backtracking, que consiste en buscar errores y retroceder hasta el punto anterior para tomar otra alternativa. Para conseguir esto, se basa en estructuras de datos arbóreas que facilitan la búsqueda de patrones. Todas estas características combinadas convierten este lenguaje en uno de los más flexibles. [4]

### 4.4. JAVA

- Java es un lenguaje de programación orientado a objetos que posee las herramientas necesarias para trabajar en proyectos de Inteligencia Artificial. Las características más destacadas de Java son la transparencia, la mantenibilidad y la portabilidad. Permite codificar algoritmos muy fácilmente y es un lenguaje escalable. Teniendo en cuenta que una IA está basada en gran medida en estos algoritmos, Java es una muy buena opción. Además, dispone de interfaces de datos muy atractivas para mejorar la experiencia del usuario.[4]

### 4.4. C++

- Java es un lenguaje de programación orientado a objetos que posee las herramientas necesarias para trabajar en proyectos de Inteligencia Artificial. Las características más destacadas de Java son la transparencia, la mantenibilidad y la portabilidad. Permite codificar algoritmos muy fácilmente y es un lenguaje escalable. Teniendo en cuenta que una IA está basada en gran medida en estos algoritmos, Java es una muy buena opción. Además, dispone de interfaces de datos muy atractivas para mejorar la experiencia del usuario.[4]

### 4.4. Torch

- Torch no es únicamente un lenguaje de programación. También es una librería de Machine Learning y un framework de computación científica. Provee de un amplio rango de algoritmos para el aprendizaje automático y se basa en LuaJIT. Este lenguaje aprovecha toda la potencia de la GPU para trabajar en Inteligencia Artificial. [4]

## CONCLUSIONES

Con el desarrollo de un software capaz de desempeñar el papel de rival, con unas características mejoradas del jugador al que se enfrenta, los mismos serían capaces de aprender de la IA, de manera que responderían de la misma forma que lo haría su enemigo, lo que conllevaría a una mejora del rendimiento del jugador, solo por el hecho de enfrentarse a una versión mejorada de si mismo. Con esto, también estaríamos mejorando, de manera paralela, el rendimiento del software, ya que los datos serían distintos y mejores al mismo tiempo, por lo que ahora, nuestra IA aprendería formas más óptimas de mejorar dichos datos.

## REFERENCIAS

- [1] Web de información sobre aprendizaje automático: [https://es.wikipedia.org/wiki/Aprendizaje\\_autom%C3%A1tico](https://es.wikipedia.org/wiki/Aprendizaje_autom%C3%A1tico) (Enlace web)
- [2] Web sobre las diferencias entre aprendizaje supervisado y no supervisado: <https://medium.com/@juanzambrano/aprendizaje-supervisado-o-no-supervisado-39ccf1fd6e7b> (Enlace web)
- [3] Web sobre aprendizaje por refuerzo: <https://spainml.com/blog/aprendizaje-por-refuerzo-una-breve-introduccion/> (Enlace web)
- [4] Web sobre lenguajes recomendados para machine learning: <https://www.digitaltechinstitute.com/8-mejores-lenguajes-de-programacion-para-ia/> (Enlace web)
- [5] Temario de la asignatura de Bioinformática del Grado de Ingeniería Informática en Sistemas de Información de la Universidad Pablo de Olavide.



**Daniel Emilio Luque López**, actualmente estudiante de la Escuela Politécnica Superior de la Universidad Pablo de Olavide, el grado de Ingeniería Informática en Sistemas de Información.

# Goma II y su uso por el grupo terrorista ETA

Francisco Rafael Ruiz Alpresa

**Resumen**—Aprovechando la creación nacional del explosivo Goma-2 y, su uso por parte del grupo terrorista ETA, vamos a profundizar sobre su composición, sus aplicaciones en la industria y, por último, su uso para fines criminales.

**Palabras Claves**— ETA, Explosivo Goma-2 EC, Goma-2 ECO, MAXAM.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Goma-2 es un explosivo del tipo dinamita (compuesto por serrín empapado en nitroglicerina, lo cual hace a este explosivo más estable que la nitroglicerina pura, aunque sigue siendo un explosivo sensible a los golpes).

La Goma-2, según la clasificación hecha por el autor del artículo "Tipos de explosivos" [1] y, en consonancia con lo declarado por J.A.W. Cabrera [2], es un explosivo gelatinoso con consistencia plástica, se caracteriza por su gran potencia, elevada velocidad de detonación, gran resistencia al agua (debido a su alta densidad) y a los cambios de temperatura. Es un explosivo que no produce muchos gases tóxicos y, además, si se conserva adecuadamente puede ser almacenado durante mucho tiempo sin perder sus propiedades explosivas.

De fabricación española, en un principio se ideó como un explosivo con fines de uso industrial, aunque como veremos, ha sido utilizada también en determinados crímenes. Sobre todo, nos centraremos en su uso por parte del grupo terrorista ETA.

En España este explosivo fue usado de manera frecuente en la industria, en concreto, en la minería: voladuras de rocas duras y semiduras y trabajos con presencia de agua. Además, España es un país que exporta este tipo de explosivo al extranjero.

## 2. FABRICACIÓN GOMA-2

Como ya hemos dicho previamente, la Goma-2 se creó en España, por la Unión Española de Explosivos, S.A (ahora MAXAM). Según relata la propia web de la compañía [2], en 1896, la compañía que Alfred Nobel fundó en 1872, llamada Sociedad Española de la Pólvora Dinamita con sede en Galdácano (Bilbao), España, se fusionó con otras ocho sociedades, dando lugar a la Unión Española de

Explosivos, S.A (UEE). Fue a partir de 2006 cuando UEE pasó a llamarse MAXAM.

Este explosivo estaba principalmente destinado a su empleo en el sector de la industria, más en concreto en la minería, como ya hemos dicho previamente.

En la actualidad, este explosivo se fabrica principalmente en Páramo de Masa, Burgos (España), cuyas instalaciones tienen una capacidad de producción anual de 15.000 toneladas aproximadamente. La fábrica de explosivos de Páramo de Masa se encuentra en el municipio de Quintanilla-Sobresierra.

Allí, la producción se focaliza en los productos Goma-1, Goma-2, Goma ECO, Explosivo de Seguridad nº 9, Riogel EP y, Pentrita.

### 2.1. Composición

La dinamita es conocida como un tipo de explosivo compuesto por nitroglicerina o trinitrotolueno y dióxido de silicio en forma de tierra de infusorios. Por su estabilidad, sustituyó a la nitroglicerina en la minería y las demoliciones, además de en la industria de armamento militar.

La Goma-2 es un tipo de dinamita, que mezcla los siguientes productos: nitrato de amonio (se estima que entre un 60 y un 70 por ciento), dinitrato de etilenglicol (EGDN) (entre un 26 y un 31 por ciento), y algodón (porcentaje restantes). Al igual que ocurre con la dinamita, debido a su estabilidad, se requiere el empleo de detonadores para que estallen. Comúnmente se emplean con este propósito el peróxido de acetona (TATP) o el hexametileno triperóxido de diamina (HMTD).

A estos explosivos se les llama goma debido a su aspecto gelatinoso. En definitiva, vienen a ser dinamitas compuestas por dinitratos de etilenglicol, nitrato de amonio, nitrocelulosa, carbonato de calcio y harina, entre otras sustancias.

### 2.2. Tipos de Goma-2

Tal y como explica I. Salamanca en su artículo sobre este explosivo [4], en España se comercializan principalmente dos tipos de explosivo Goma-2: la Goma-2 EC y la Goma-2 ECO, ambos comparten una composición parecida.

El primero de ellos (Goma-2 EC), que fue la primera variante que se creó del Goma-2, es un potente explosivo, el cual se compone en un 7% de dinitrotolueno (DNT). El dinitrotolueno es un explosivo que tiene multitud de usos industriales: en la fabricación de muebles, en la fabricación de tintes y plásticos, y también lo podemos encontrar en los airbags de los vehículos. Se trata de un compuesto sintético, altamente tóxico, que se usa en la producción de trinitrotolueno (TNT).

La segunda variante, la Goma-2 ECO, también denominada Riodín, es una versión mejorada de la primera. Debido a la alta contaminación atmosférica que producía dicho explosivo, los cuales superaban los límites de la nueva normativa europea, se desarrolló este nuevo tipo de explosivo. La composición de la Goma-2 ECO es la siguiente: nitroglicol, nitrato amónico, nitrocelulosa, ftalato de dibutilo y, carbonato cálcico. Su principal modificación fue la eliminación total del dinitrotolueno (DNT), un producto altamente tóxico. Con este cambio en la composición, se consiguió una reducción de hasta un 68% en la emisión de óxidos de nitrógeno y dióxidos de carbono.

Aunque poseen una potencia explosiva parecida, sí es cierto que la Goma-2 ECO es algo más potente que la Goma-2 EC.

TABLA 1  
DIFERENCIAS EN COMPOSICIÓN

	Goma 2 ECO*	Goma 2 EC*
Dinitrotolueno		◆
Trinitroglicerina		
Etién glicol dinitrato		
Nitroglicol	◆	◆
Nitrocelulosa	◆	
Nitrato amónico	◆	◆
Ftalato de dibutilo	◆	
Carbonato cálcico	◆	
Harina	◆	

elmundo.es

## 2. USO POR EL GRUPO TERRORISTA ETA

Fue utilizada por la banda terrorista ETA en sus primeros años de actividad terrorista, aprovechando su sencillo montaje, y su compleja desactivación, según explica I. Salamanca [4]. Estas facultades hacen al explosivo idóneo

para un grupo terrorista, aunque como a continuación veremos no fue el único explosivo que usó ETA.

La Goma-2 más usada por ETA en sus atentados fue la EC, no la ECO. A pesar de que fue comercializada en España también, era más complicada su adquisición en el mercado negro nacional, a lo que debemos añadir que cada vez el grupo terrorista tenía más complicaciones a la hora de sustraer de manera ilegal de polvorines españoles este tipo de explosivo.

A continuación, con el soporte documental del artículo de El País "Todos los coches bomba de ETA" [5], citaremos algunos atentados conocidos de ETA, en los que empleó Goma-2.

Uno de los atentados con más repercusión fue el asesinato del presidente del Gobierno, almirante Luis Carrero Blanco, el 20 de diciembre de 1973. Entre 80 y 100 kilogramos del explosivo fueron utilizados por la banda terrorista ETA en la denominada Operación Ogro. La explosión fue tan poderosa que lanzó el coche de Blanco por encima de un edificio de cinco pisos.

El 31 de octubre de 1982, con la explosión de 10 kilos de Goma-2 colocada dentro de un coche aparcado en Vitoria, ETA mató a un policía nacional hiriendo a otros 8.

Años más tarde, en mayo de 1985, se produjo un atentado fallido con un coche bomba cargado de 25 kilos de Goma-2 estacionado en las inmediaciones de la casa cuartel de la Guardia Civil de Llodio, en Álava. No provocó muerte alguna, pero sí causó fuertes daños materiales.

Otro caso de renombre, fue el atentado perpetrado el 14 de julio de 1986 en Madrid. En un vehículo de gran tamaño habían introducido 35 kilos de Goma-2, con los que consiguieron matar a 12 guardias civiles y herir a 45 personas (de las cuales 7 de ellas eran civiles), el atentado más cruento hasta el momento.

En 1987, murió un comandante del Ejército y un civil, además de quedar heridas 40 personas (civiles y militares), al explotar en Zaragoza otro coche bomba con 50 kilos de Goma-2.

Sin embargo, como se explica en el artículo periodístico "¿Qué podría hacer ETA con 850 kg de explosivos?" [6] ETA no usó solo este tipo de explosivo. En sus atentados era muy común el uso de Amonal debido a su barata fabricación (con menor potencia que la Goma-2). Se trataba de un explosivo de nitrato de amonio mezclado con TNT y aluminio. Como podremos ver en el próximo párrafo, ETA fue dejando de usar Goma-2 con el aumento del uso del Amonal. Además de ser más barato, lo podían fabricar ellos mismos, evitándose la dificultad de tener que robar los explosivos, como consta en el artículo de El País

“ETA Militar fabrica su propio Amonal en el sur de Francia” [7].

Se encontró amonal, entre otros, en los siguientes atentados: Hipercor de Barcelona (19 de junio de 1987), Coche bomba en Eibar (10 de agosto de 1987), Dirección General de la Guardia Civil en Madrid (22 de noviembre de 1988), coche bomba en la casa cuartel de Irún (25 de julio de 1991), casa cuartel de Vic (29 de mayo de 1991) y, coche bomba en la Comandancia de la Guardia Civil de Murcia (10 de febrero de 1992). El grupo terrorista usó también, aunque de forma más residual el ANFO, un explosivo que mezcla nitrato de amonio con un combustible derivado del petróleo.

Existen casos documentados por la labor periodística, como el artículo de El País “ETA y el coche bomba: los atentados más sangrientos” [8], con los que podemos comprobar que ETA usó más de un explosivo. Por ejemplo, el 25 de abril de 1986, ETA mató en Madrid a 5 guardias civiles e hirió a 4 de gravedad explosionando una furgoneta bomba equipada con seis ollas exprés que contenían 20 kilos de Goma-2 y Amonal, con 48 kg de metralla. Los asesinos conseguían aumentar la potencia destructiva con la metralla y con la disposición de las ollas en forma de cañones (unas dentro de otras).

### 3. CONCLUSIONES

La historia nos ha venido enseñando que junto con los avances científicos y tecnológicos debemos implementar nuevas formas de control y vigilancia, para que el desarrollo no sea enfocado hacia el perjuicio de los demás sino para el beneficio propio.

Los explosivos, como la mayoría de inventos, pueden ser usados con múltiples fines, algunos opuestos entre ellos; desde fines legales y beneficiosos para la sociedad, hasta fines destructivos y perjudiciales para el orden y la seguridad.

En este caso fue un invento español, con múltiples ventajas (que ya hemos explicado en el cuerpo central de esta exposición), el que fue usado por terroristas españoles para sembrar el terror en la sociedad. Esto nos lleva irremediablemente a la necesidad de estrechar el cerco sobre el tráfico ilegal de armas y explosivos, aumentando también los controles y la vigilancia en las fábricas y almacenes de explosivos.

En definitiva, no debemos frenar el fomento y desarrollo de herramientas tan útiles para la humanidad, como son los explosivos, por miedo o desconocimiento. A su vez, no debemos olvidar esa obligación de control que tienen las instituciones públicas, a nivel legislativo, social y, policial.

### REFERENCIAS

- [1] “Tipos de explosivos”, *Blog Structuralia*, <https://blog.structuralia.com/tipos-de-explosivos>. 2016
- [2] J. A. W. Cabrera, “ Explosivos: tipos y propiedades”, *Monografias.com*, <https://www.monografias.com/trabajos83/explosivos-tipos-y-propiedades/explosivos-tipos-y-propiedades2.shtml>.
- [3] Web de Maxam. <https://www.maxam.net/buscador>.
- [4] I. Salamanca, “Explosivos: Goma-2”, *Hombre, ciencia y naturaleza*, <http://cceeirene.blogspot.com/2012/03/explosivos-goma.html>. 2018.
- [5] “Todos los coches bomba de ETA”, *El País*, febrero de 2001.
- [6] “¿Qué podría hacer ETA con 850 kg de explosivos?” *La Información*, febrero de 2016.
- [7] J. J. Echevarría, “ETA Militar fabrica su propio amonal en el sur de Francia”, *El País*, diciembre de 1987.
- [8] M. C. Belaza, “ETA y el coche bomba: los atentados más sangrientos”, *El País*, abril de 2018.



**Francisco Rafael Ruiz Alpresa** estudiante de último curso del doble grado en Derecho y Criminología, en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

# DMT: el psicotrópico natural

Juan F. Vera Ruiz

**Resumen**— El DMT es una droga interesante que presenta una estructura molecular muy sencilla; esta droga está presente en la naturaleza y en pequeñas cantidades en el cuerpo humano, lo que hace llamar aún más la atención. Además de sus efectos psicodélicos intensos y efímeros en las diferentes formas de consumo que tiene. A su vez se hace un análisis legal sobre su estatus en nuestro país.

**Palabras Claves**— DMT, droga, psicotrópico, naturaleza, enteógeno, alcaloide,

## 1. INTRODUCCIÓN

El DMT son las siglas por las que se conoce a la **Dimetil-triptamina** o también N, N-Dimetiltriptamina. Esta droga familia de las triptaminas. Es considerada como una de las más potentes existentes actualmente en la naturaleza. Es a su vez una droga enteógena, es decir, es un compuesto natural (preparado de sustancias vegetales), alucinógeno con un tiempo de actuación cortos y efectos muy intensos en periodos de tiempo mínimos comparado con otros tipos de alucinógenos.

Se consume por lo general en su forma básica, pero al ser más estable como una sal se utiliza en forma de cristal de color blanco casi transparente; y como ocurre con todas las drogas en formas de cristal cuando se procede a su venta en el mercado ilegal suelen aparecer tonalidades amarillentas y oscuras a consecuencia de las impurezas que surgen al ser elaboradas de forma sintética. Para su elaboración es necesario partir de una base de indol utilizando cloruro, dimetilamina y como reactivos: hidruro de litio y aluminio.<sup>1</sup>

El DMT ha sido una droga utilizada por las tribus indígenas y por chamanes espirituales durante mucho tiempo en diferentes rituales, a través de brebajes realizados por ellos mismos en ceremonias.<sup>2</sup>

Sus efectos son intensos pero efímeros, ya que es una droga psicoactiva muy poderosa, produciendo alucinaciones visuales, euforia, conversaciones con entes astrales e incluso vivir a lo que se asemeja a una experiencia cercana a la muerte. Es por ello por lo que cada vez más curiosos de las drogas alucinógenas la consumen, convirtiendo esta droga espiritual en una droga recreativa. No solo a particulares, sino que en este último siglo ha captado la atención de científicos del mundo que, debido a sus efectos intensos sobre la mente, y por su presencia de forma natural en el cuerpo humano han decidido estudiarla a fondo para buscar sus beneficios, y profundizar en sus características.

## 2. UNA DROGA PRESENTE EN LA NATURALEZA Y EN EL CUERPO HUMANO

Esta droga fue sintetizada por primera vez en 1931, aunque fue a mediados de los años 50 cuando se descubrieron sus efectos alucinógenos; aunque de forma natural se lleva consumiendo desde tiempos ancestrales. Es conocida por estar presente tanto en las plantas como en los animales (cerebro de los mamíferos), incluido en los humanos, llegando estudios a afirmar que es una sustancia que es segregada por varios órganos de nuestro cuerpo, como la glándula pineal, teniendo su mayor actividad en los sueños y en situaciones de gran estrés.

### 2.1. Plantas que contienen DMT

Está presente en las siguientes plantas:

1. Yopo
2. Psychotria viridis
3. Banisteriopsis caapi
4. Diplopterys cabrerana
5. Phalaris arundinacea
6. Phalaris aquatica

La mezcla de algunas de estas plantas se obtiene la Ayahuasca, bebida descubierta y elaborada por los indígenas del Amazonas, presentando como componente principal el DMT, responsable primario de los efectos alucinógenos de este zumo.<sup>3</sup>

### 2.2. DMT y cuerpo humano.

Varios científicos y médicos como Rick J. Strassman (doctos en psiquiatría), ha defendido la hipótesis de la existencia del DMT en el cuerpo humano; llegando a afirmar que el cerebro transporta DMT a través de la barrera hematoencefálica y sus tejidos, y de igual modo lo transporta a través del sistema defensivo. Aseguraba también que donde estaba más presente el DMT era en la glándula pineal, y que era segregada en los sueños, de ahí que las experiencias oníricas fuesen tan intensas en determinadas ocasiones.

También asoció la segregación del DMT con los estados excesivos de estrés humano, causando que el aumen-

to de adrenalina y de enorfina estimulen la expulsión del DMT de la glándula pineal; por ejemplo, uno de los momentos de mayor estrés ocurre cuando tenemos experiencias cercanas a la muerte. Por todo ello, llamé a esta sustancia como la "molécula del espíritu"<sup>4</sup>

El DMT también es creada en pequeñas cantidades por el cuerpo humano durante el metabolismo de la enzima triptamina N-metiltransferasa, una enzima encontrada en la médula suprarrenal que convierte la noradrenalina (hormona neurotransmisora encargada del aumento de la presión arterial y ritmo cardíaco) en adrenalina.

### 3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Podemos considerar al DMT como un compuesto químico muy simple ya que solo presenta dos modificaciones. Se trata de una sustancia orgánica derivada de la triptamina que presenta dos grupos de metil en el átomo de nitrógeno. Generalmente es manejada como fumarato en forma de sal. Las sales de DMT cuando se evaporan de un solvente y se depositan sobre un vidrio comenzará a formarse las sales en forma de aguja blanca cristalinas hacia arriba, estas sales con forma de aguja son muy solubles en el agua, y si no son conservadas a una temperatura notablemente fría corren el riesgo de descomponerse, por esta razón se conservan en los laboratorios congeladores.

No se debe confundir con la Bufotenina (5-HO-DMT), sustancia que se obtiene de las glándulas del sapo *Bufo Alvarius*, ni con el 5-MeO-DMT, que surge tras la combustión de la anterior sustancia, aunque son parientes y todos ellos son psicotrópicos, no tienen la misma estructura molecular.

A su vez es un **alcaloide triptaminico con núcleo de indol** siendo el DMT de los más simples existentes, comparado con el LSD (con un peso molecular de 323 g/mol) y la mescalina (211 g/mol). Además, actúa como agonista de algunos tipos de receptores de la serotonina, como otras drogas psicodélicas. Presenta también una estructura química similar al neurotransmisor serotonina.

La fórmula química es la siguiente:  $C_{12}H_{16}N_2$  presentando un peso molecular de 188'274 g/mol

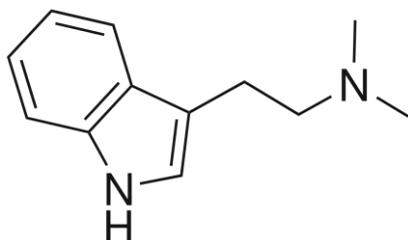


Fig. 1. Estructua del DMT.

#### 3.1. Biosíntesis

La biosíntesis del DMT resulta un proceso químicamen-

te sencillo, para ello necesita el aminoácido esencial (el cuerpo humano no lo puede sintetizar) llamado L-triptófano, obtenido de los alimentos<sup>5</sup>. Una vez que este aminoácido se ha descarboxilado por su correspondiente enzima, surge el triptófano descarboxilado (el análogo químico es la triptamina), este proceso es similar a lo que ocurre con el 5-Hidroxitriptófano a serotonina.

El triptófano carboxilado sufre a continuación una transmetilación, protagonista de este paso es la enzima INMT, sirviendo como catalizador para que se de el cargo de grupo metilo; de esta reacción surge la **N-metiltryptamina (NMT)**, sintetizado en el cuerpo humano como el producto final del metabolismo de L-triptófano<sup>6</sup>, el NMT no tiene efectos psicoactivos debido a la enzima MAO (monoaminoxidasa) que inhibe dichos efectos. Para que para que se convierta en DMT es necesario que sea transmetilado por el mismo proceso.<sup>7</sup>

### 4. EFECTOS

Los efectos del DMT son descritos como efectos muy intensos y de carácter efímero, ya que suelen durar entre 5 y 30 minutos si es fumada, y si es consumida oralmente ascienden a 2-5 horas, pero de intensidad media; es por ello que se ha logrado el título de la droga alucinógena más poderosa del mundo, mayor incluso que el peyote (enteógeno) y el LSD (droga sintética), a los que los efectos se asemejan, aunque no del mismo modo.

Los efectos son considerados como un viaje introspectivo, donde se reflexiona en una realidad alterada, y en el que se adquieren sentimientos de euforia y alegría inmensa. La gravedad no se percibe de la misma forma, sintiéndose el sujeto consumidor más ligero, además de que la percepción del tiempo varía de un modo considerable, al igual que la percepción de visual (se perciben colores, brillos, distorsiones con los ojos abiertos), y auditiva; también se experimenta la sensación de estar fuera del propio cuerpo, y de visibilizar la vida "en tercera persona".

Otros efectos no tan buenos ni placenteros son: las náuseas constantes, la desorientación, aumento de la frecuencia cardíaca que puede conducir a una crisis de ansiedad, y derivar en una psicosis por el miedo a una muerte inminente. Esto puede ser grave porque al no tener control sobre la mente puede tener efectos secundarios adversos irremediables, y sin olvidar que, si la persona no está sana mentalmente, su problema puede empeorarse.

Tras su consumo se manifiestan en el sujeto unas sucesiones de viajes esporádicos (comúnmente conocidos como flashbacks) y sueños extraños que se prolongan en el tiempo.

Es posible que el sujeto sufra un mal viaje tras su consumo, y a causa de ello afloran los sentimientos de negatividad y ansiedad, se tiene un miedo constante a la muerte, se reviven traumas ocultos en el subconsciente, y sobre todo una desorientación y confusión constante, que puede ser fatal.

Aunque con el DMT **no** desarrolla una **dependencia física** en el ser humano, su consumo por primera vez causa en ocasiones fase conocida como "luna de miel" en la cual la persona tiene deseos intensos de volver a consumir DMT y así poder revivir a esas sensaciones fuertes y placenteras, esto puede derivar en un consumo abusivo, y en una dependencia psicológica, provocando un consumo descontrolado y pudiendo afectar al cerebro.

#### 4.1. Formas de consumo.

El DMT se puede consumir de varias formas: vía **oral**, vía **intravenosa** (método utilizado por el médico Rick J. Strassman en sus experimentos con el DMT) y **fumada**.

La que requiere una comprensión química para saber cómo funciona una vez en el cuerpo humano es en el consumo por vía oral, al ser más complejo el proceso que los demás.

Si el DMT es consumido oralmente sin más, al entrar en el estómago es destruido por la enzima presente en el mismo conocida como monoaminoxidasa (MAO), enzima encargada a su vez de la regulación de la degradación metabólica de serotonina, noradrenalina y dopamina, entre otros; entonces, para que el DMT haga efecto es necesario que se inhiba la actuación de dicha enzima, lográndose mediante el consumo oral mezclado con alguna sustancia inhibidora de la monoaminoxidasa, es decir, una sustancia IMAO. Algunas sustancias IMAO son los alcaloides de clase beta-carbolina (presentes en algunas plantas). Una vez consumido el DMT con la sustancia IMAO comenzarán a aparecer los efectos, proporcionando una experiencia espiritual lenta, pero intensa. La sustancia IMAO para que sea efectiva deberá consumirse 30 minutos antes, o en su defecto conjuntamente.

Se debe tener especial cuidado con las IMAOS ya que puede haber consecuencias letales si son mezcladas con algunos medicamentos, como son los antidepresivos ISRS (inhibidores selectivos de la recaptura de la serotonina).<sup>2</sup>

Esta droga en sus otras vías de consumo tampoco se debe mezclar con anfetaminas, cocaína o MDMA ya que puede aparecer un riesgo agudo de **síndrome serotoninérgico** (causado por el exceso de serotonina), pudiendo dar lugar a un coma e incluso la muerte.

En lo respecto a las intoxicaciones únicamente por consumo de DMT no se tienen datos casos. Los existentes son por consumo de DMT junto con las drogas mencionadas anteriormente.

### 5. ESTADO LEGAL EN ESPAÑA.

El DMT no es una droga muy conocida en el ámbito nacional, aunque por ello no significa que sea legal. Según el Informe de España del 2017 sobre drogas se clasifica en las tablas y gráficas como "Otras drogas" ocupando el 6% del consumo (compartido con el LSD, setas alucinóge-

nas...)<sup>8</sup>

En España, el delito de tráfico de drogas y las sanciones administrativas por tenencia de drogas se considera como una **norma penal en blanco**, esto significa que el precepto contiene la pena, pero se requiere acudir a los convenios internacionales ratificados por España para saber lo que es exactamente un estupefaciente, droga tóxica y sustancia psicotrópica. En concreto a los anexos al Convenio de Viena de 21 de febrero de 1971 sobre psicotrópicos, definiendo a tales como aquellas sustancias que puedan producir un estado de dependencia y estimulación o depresión del sistema nervioso central, y que tengan como resultado alucinaciones o trastornos de la función motora o del juicio o del comportamiento o del estado de ánimo (art 2.4)<sup>9</sup>. En España se acogerá como sustancias psicotrópicas las incluidas en los anexos del Convenio mediante el Real Decreto 2829/1977 de 6 de octubre, regulador de las sustancias y preparados medicinales psicotrópicos. En concreto el DMT se encuentra en la lista de este mismo convenio, introducido en los anexos de la Lista I.

El estatus legal por lo tanto es lo mismo que otras drogas ilegales en España, por lo cual su consumo y la tenencia mínima personal del DMT en espacios públicos está sancionado administrativamente con **multas** de 601 a 30.000 euros, al ser considerado como una infracción grave en el artículo 36 del a Ley Orgánica de Protección de la Seguridad Ciudadana. Y si se procede a la venta del DMT se le impondrá la pena de **prisión** de 1 a 6 años, comportando del mismo modo una pena complementaria de multa. Sin perjuicio de los agravantes.

### 6. CONCLUSIONES

Como se ha podido apreciar a lo largo de este artículo el DMT es una droga que a primera vista puede resultar muy simple químicamente hablando, pero todo lo que hay detrás es un gran desconocido que aún no se ha investigado a fondo sobre ello. Efectos espirituales fuertes, y aún están por determinarse los efectos terapéuticos que pueda tener esta droga, como por ejemplo ayudar con la depresión, con la adicción a otro tipo de drogas como la metanfetamina e incluso con algunos problemas psiquiátricos como la esquizofrenia.

La potencia y su interés alucinógeno de sus efectos, además de la ausencia de dependencia física puede causar que acabe convirtiéndose en una droga recreativa, creando sobre ella un tabú que no será bien adoptada por la comunidad científica, pudiendo de este modo disminuir sus experimentos con ella.

### REFERENCIAS

- [1] MacRae, Edward (23 de marzo de 1999). «The Ritual and Religious Use of Ayahuasca in Contemporary Brazil»

- [2] National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6089, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6089> (accessed Dec 26, 2018).
- [3] Schultes, Richard Evans; Hofmann, Albert (2010) [1979], *Plantas de los Dioses - Orígenes del Uso de los Alucinógenos* [Plants of the Gods: Origins of Hallucinogenic Use], México, D.F.: Fondo de Cultura Económica, pp. 124-135
- [4] Rick J. Strassman. 2001, *DMT: "La molécula del espíritu"*. Park Street Press.
- [5] Sainio EL, Pulkki K, Young SN. L-tryptophan: biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids* 1996;10:21-47
- [6] Tryptophan metabolism Kanisha Laboratories <https://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00380.html> (accessed 29/12/2018).
- [7] Rosengarten H.; Friedhoff A.J. (1976). «A review of recent studies of the biosynthesis and excretion of hallucinogens formed by methylation of neurotransmitters or related substances».
- [8] Observatorio europeo de las Drogas y Toxicomanías (2017) España. Informe del País sobre drogas 2017 [http://publications.europa.eu/resource/ellar/a727fa89-57bd-11e7-a5ca-01aa75ed71a1.0002.03/DOC\\_1](http://publications.europa.eu/resource/ellar/a727fa89-57bd-11e7-a5ca-01aa75ed71a1.0002.03/DOC_1) (consultado 29/12/2018)
- [9] Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas 1971.

**Juan F. Vera Ruiz.**

Estudiante de Derecho y Criminología en la Universidad de Pablo de Olavide.



# Obtención de electricidad a partir de plantas. La energía ¿fitovoltaica?

Nieves Botello García

**Resumen**—Obtención de energía limpia y renovable a partir de seres vivos. Aproximación a la consecución de energía eléctrica a partir de pilas de combustible microbiano alimentadas por plantas. Breve explicación de su mecanismo de funcionamiento. Aplicaciones actuales.

**Palabras Claves**—Bioenergía, pila de combustible microbiano, biocatalizador.

## 1. INTRODUCCIÓN

El uso masivo de combustibles fósiles que desde la revolución industrial ha hecho la humanidad está teniendo graves consecuencias para nuestro planeta. Si a ello le unimos que este tipo de fuente de energía terminará por agotarse, el ser humano se ve abocado a la búsqueda de nuevas fuentes de energía. Estas tienen que ser limpias para que no perjudiquen el medio ambiente y, con ello, nuestra salud. Y además han de ser renovables, es decir, que no tengan fecha de caducidad. Dentro de este ámbito, podemos situar la energía hidráulica, que es la que más tiempo lleva con nosotros, la eólica y la solar, que son las que están en franco crecimiento, la geotérmica, las mareales y, por último, las de origen biológico, que son las más novedosas y desconocidas por el público en general.

## 2. BIOENERGÍAS RENOVABLES

Entre las posibilidades que ofrecen los seres vivos para la obtención de energía eléctrica limpia, podemos encontrar las celdas o pilas de combustible microbiano [1]. Éstas consisten en un cultivo de microorganismos, (por lo general bacterias *Geobacter Sulfurreducens*) que, mediante oxidación de materia orgánica que se les suministra, pueden producir energía.

Otro tipo serían las energías que se obtienen a través de la fotosíntesis. Recientemente, investigadores del Imperial College de Londres, de la Universidad de Cambridge y de Central Saint Martins [2] han conseguido fabricar un papel en el que se han efectuado impresiones de nanotubos de carbono. Sobre estos nanotubos se han impreso a su vez, cianobacterias que, mediante fotosíntesis, producen electricidad, tanto de día, como de noche. La cantidad de energía obtenida mediante este sistema no es mucha, aunque podría ser suficiente para la alimentación de pequeños dispositivos. Se abre así un amplio abanico de posibilidades de aplicación. Campos como el de la medicina, donde se podría usar en sensores para monitorizar pacientes con diabetes o el de la domótica, donde papeles pintados de este tipo se pueden usar

controlar la calidad del aire de una estancia, podrían beneficiarse de estos pequeños dispositivos.

No obstante, es en la energía obtenida utilizando plantas donde parece que hay un mayor futuro en el campo de las bioenergías.

## 3. ¿CÓMO OBTENER ENERGÍA ELÉCTRICA DE UNA PLANTA?

A decir verdad, según la tesis de Koen Wetser [3], no es la propia planta la que, por sí misma, genera electricidad, sino que se trata de un tipo de pila de combustible microbiano que es alimentada de manera continua por los excedentes de materia orgánica que la planta aporta al suelo.

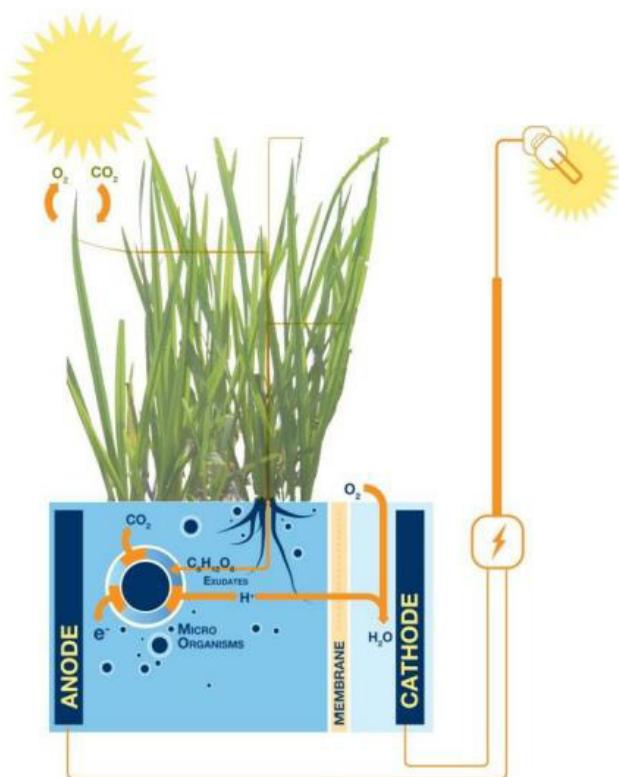
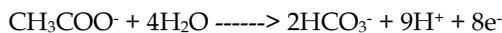


Fig. 1 Funcionamiento de la pila microbiana [4]

Como podemos ver en la figura 1, lo que la planta hace es ceder al suelo, como producto de deshecho, raíces muertas, lisados, mucílago, secreciones y exudados ricos en compuestos de carbono mediante un proceso llamado rizodeposición. Estas sustancias son reducidas por las bacterias que se encuentran en el sustrato, liberando de este modo electrones,  $\text{CO}_2$  e iones  $\text{H}^+$  que se transformarán en agua.

Así, si tomamos el anión acetato como sustancia modelo del combustible usado en el proceso, la reacción química sería :



Los electrones son recogidos por un ánodo mientras que los iones  $\text{H}^+$  que se generan en la reacción, al combinarse con el oxígeno del aire, van a producir agua. Todo ello se produce según la siguiente reacción, para la que es necesario un catalizador (platino, anión ferrocianuro, ...):



Pero estos catalizadores para la reducción del oxígeno, además de ser caros o contaminantes, terminan por agotarse. La ingeniosa solución a este problema ha sido el uso de microorganismos vivos que contengan enzimas lacasas, para poder usarlos como biocatalizadores. Estas enzimas, del grupo de las oxidasas de cobre azul, se encuentran presentes en algunas especies de plantas, hongos (*Aspergillus Nidulans*), insectos y bacterias, como la *Azospirillum Lipoferum*, *Marinomonas Mediterranea* o *Streptomyces Griseus* o *Bacillus Subtilis*. Se caracterizan por catalizar la reducción del oxígeno molecular a agua. Así, el uso de estos organismos proporciona un biocatalizador que, no sólo es barato y no contaminante, sino que además tiene la capacidad de auto-reemplazarse. [4], [5]

#### 4. APLICACIONES

Actualmente son varias las empresas que se están dedicando al desarrollo y comercialización de este tipo de células de energía limpia. En Perú, por ejemplo, auspiciado por la Universidad Tecnológica de Lima [6], se ha desarrollado un proyecto que ha conseguido suministrar luz eléctrica a la comunidad indígena de Nuevo Saposa, en una región aislada de la Amazonía peruana. Para ello han creado un innovador sistema al que han bautizado como "Plantalámpara".

Éste, como puede verse en la figura 2, no consiste más que una maceta portátil que, mediante un sistema de pila de combustible microbiano, genera energía eléctrica. La energía así producida queda almacenada en una batería que lleva incorporada, con la que se alimenta a una luz led equivalente a una bombilla normal de 50W.



Fig. 2 Modelo de "Plantalámpara" de la U.-T. de Lima [6]

En los Países Bajos, la firma Plant-e, basándose en los estudios de la Universidad de Wageningen [7] ha creado pequeños dispositivos alimentados por plantas, consiguiendo generar con ellos un voltaje máximo de 0,7 V.

Pero es en España, con la start-up Bioo donde se ha conseguido el avance más significativo [8]. Esta firma, fundada por los andaluces Javier Rodríguez Macías, Pablo Vidarte Gordillo y Alexandre Díaz Codina, mediante una selección más precisa tanto de plantas, como, sobre todo, de los microorganismos encargados de la generación de la corriente, han fabricado dispositivos capaces de generar hasta diez veces más potencia que los otros sistemas. Esto les ha llevado a cosechar premios como el de la Empresa más Innovadora de Europa concedido en 2017 por el Parlamento Europeo, el de la Empresa más Disruptiva del año 2016 otorgado por Google o estar incluida en la lista Europea de Forbes Under 30. Han puesto en el mercado kits educativos para laboratorios de secundaria, plantas en macetas capaces de cargar un móvil, paneles de 1 m<sup>2</sup> capaces de producir entre 3 y 40 W e incluso una maceta que sirve de repetidor para acceder a una red wi-fi externa sin gasto energético alguno.

#### 5. EL FUTURO

Con un jardín de 100 m<sup>2</sup> de césped, o 15 m<sup>2</sup> de arbustos o árboles, ya que con plantas mayores la producción eléctrica aumenta, sería suficiente para las necesidades energéticas de una familia media. Pero ¿y si se usaran en jardines públicos? Ya hay un acuerdo de Bioo con el Ayuntamiento de Sant Cugat del Vallés para implantarlo en los jardines de la ciudad. ¿Y si se combinan con invernaderos solares? En la Universidad de California Santa Cruz [9] ya están estudiando este tipo de invernaderos para obtener energía fotovoltaica. ¿Y si se instalase en los green-roofs (tejados verdes) tan extendidos en el norte de Europa? ¿O en las grandes extensiones dedicadas a la agricultura? ¿O si se cultivaran bosques tan sólo como plantas de generación de energía? Son múltiples las posibilidades que ofrece este tipo de energía, que no sólo sería ya de por sí limpia, sino que contribuiría a regenerar nuestro planeta.

## REFERENCIAS

- [1] "Celda de combustible microbiano - Wikipedia, la enciclopedia libre." [Online]. Available: [https://es.wikipedia.org/wiki/Celda\\_de\\_combustible\\_microbiano](https://es.wikipedia.org/wiki/Celda_de_combustible_microbiano).
- [2] "Wallpaper bio-solar panel developed by researchers | Imperial News | Imperial College London." [Online]. Available: <http://www.imperial.ac.uk/news/182936/wallpaper-bio-solar-panel-developed-researchers/>.
- [3] K. Wetsler, "Electricity from wetlands Technology assessment of the tubular Plant Microbial Fuel Cell with an integrated biocathode." [Online]. Available: <https://research.wur.nl/en/publications/electricity-from-wetlands-technology-assessment-of-the-tubular-pl>
- [4] M. Helder, "Design criteria for the Plant-Microbial Fuel Cell Electricity generation with living plants-from lab to application." [Online]. Available: <https://edepot.wur.nl/239054>
- [5] "Lacasas - Wikipedia, la enciclopedia libre." [Online]. Available: <https://es.wikipedia.org/wiki/Lacasas>.
- [6] "'Plantalámparas': Plantas que dan luz | Universidad de Ingeniería UTEC." [Online]. Available: <https://www.utec.edu.pe/plantalamparas-plantas-que-dan-luz>.
- [7] "Plant-e | Spark of Nature." [Online]. Available: <https://www.plant-e.com/en/>. [Accessed: 22-Apr-2020].
- [8] "Bioo | Official Site." [Online]. Available: <https://www.biotech.com/>.
- [9] "Solar greenhouses generate electricity and grow crops at the same time, UC Santa Cruz study reveals." [Online]. Available: <https://news.ucsc.edu/2017/11/loik-greenhouse.html>.



**Nieves Botello García.** Estudiante de 2º de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

# Aplicación de radiografía en el Patrimonio Histórico

Rodrigo Villalobos Ruiz

**Resumen**—En este artículo se resume la utilización de tecnologías que no requieren la toma de muestra para el análisis de los bienes culturales, haciendo énfasis en las radiografías y la información que se puede obtener de ellas dependiendo de las situaciones en que sean aplicadas. Se mencionan algunos ejemplos de aplicación en diversos materiales y, además, se detalla el caso particular de una pintura al óleo de la Virgen de Guadalupe (Siglo XVII) del Museo Casa de la Zacatecana, en Querétaro, México.

**Palabras Claves:** Radiografía, Rayos X, Patrimonio Histórico.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estudio del Patrimonio Histórico y sus técnicas de análisis han evolucionado conforme a la especialización y la importancia que ha revestido su conservación en los últimos años. Con esto se hace alusión al hecho de que, aunque se tiene registro de que las actividades de conservación sobre bienes patrimoniales datan de hace varios siglos atrás [1], el uso de métodos científicos y la adaptación de distintos equipos, materiales y metodologías diseñados para otras disciplinas, ha representado una importancia mayor en las últimas décadas, lo que ha permitido el conocimiento global de los objetos culturales, mejorando las aproximaciones y las formas en que estos son abordados por especialistas.

Por ejemplo, ahora es posible conocer las técnicas de ejecución de los distintos bienes, el proceso creativo de cada artista e incluso diferenciarlo o especificarlo del resto, los propios cambios o modificaciones realizados por el mismo autor, los pigmentos o materiales componentes como los aglutinantes o vehículos, los cambios o deterioros sufridos al paso del tiempo, el número de estratos o componentes que conforman el objeto, y un sinnúmero de características más. De manera muy específica, se cuenta con técnicas de análisis denominadas Técnicas No Destructivas -término controversial que no es aceptado por muchos especialistas [2] - que no alteran o modifican la obra, es decir, no es necesario invadirla o tomar una muestra, sino que funcionan y arrojan datos manteniendo un respeto total por la integridad material del Patrimonio. Entre ellas tenemos las que basan su examen en la utilización de ondas del espectro electromagnético, como lo son los ultrasonidos, la luz ultravioleta, la radiación infrarroja y los rayos X. Estos últimos son de las primeras tecnologías desarrolladas para otras disciplinas y aplicadas al Patrimonio Cultural.

## 2. RAYOS X

Descubiertos en 1895, por el físico alemán Wilhelm Conrad Röntgen, los rayos X son ondas de radiación del espectro electromagnético de menor longitud que el rango de luz

visible, ya que estas corresponden a entre 10 y 0,01 nm.

Para el caso específico del uso de rayos X en la toma de radiografías, el principio base de este análisis es la absorción específica, o atenuación, de la radiación por parte de los distintos materiales, llamada radiodensidad, dependiendo de su número atómico, espesor y densidad, lo que permite que estos sean penetrados -o no- por dichas ondas, y la diferencia entre estos factores quede registrada en una placa radiográfica, formando una imagen resultante en -podría decirse- escala de grises, en la que las zonas que se observan más claras son aquellas con una radiodensidad superior, y las más oscuras fueron mayormente penetradas.

## 3. RAYOS X Y SU APLICACIÓN EN EL ESTUDIO DEL PATRIMONIO HISTÓRICO

La forma en que la radiación X es absorbida y atraviesa la materia es una propiedad que depende de cada sustancia y se puede utilizar en pro del estudio de los diferentes materiales del Patrimonio Histórico. Es decir, el empleo de esta técnica no destructiva -sin toma de muestra- puede utilizarse con distintos objetivos dependiendo del bien en que se aplique.

A continuación, realizaremos un breve repaso sobre algunos de los principales materiales y la información que se puede obtener de los bienes elaborados con ellos.

### 3.1 Metales

Dentro del gran panorama de objetos elaborados en metal, quizá los más radiografiados son aquellos en contexto arqueológico, pues el estado de conservación la mayoría de las veces no es el más óptimo y no permite la correcta apreciación del objeto en ese ambiente.

Dependiendo del tipo de bien, es factible conocer su técnica de manufactura, ya sea por fundición, unión mecánica, soldadura, vaciado, forja, etc., y el número de componentes del mismo. Así mismo, y probablemente como principal uso, el análisis por rayos X permitirá realizar una correcta cuantificación del estado de conservación de los bienes, pues a través de la imagen se puede interpretar el estado actual del núcleo metálico si es que se encuentra cubierto

por los productos de corrosión, ya que estos se conforman de una manera diferente a dicho núcleo: como una red cristalina [3].

Sin embargo, a pesar de toda la información que nos puede arrojar el análisis radiográfico, es necesario conocer de manera previa muchos aspectos del bien cultural estudiado, para determinar con certeza qué es lo que se desea obtener de manera precisa, para saber cómo proceder con el trabajo.

Una de las desventajas de la aplicación de rayos X para la obtención de imágenes radiográficas es la propia conformación de los objetos metálicos, pues al ser tridimensionales, la posición de los mismos sobre la placa puede crear interferencias por superposición que deriven en una mala interpretación, por ello se insiste en el conocimiento previo y global del bien.

### 3.2 Escultura Policromada

En este apartado en específico, nos referiremos a la escultura policromada en soporte de madera, de la cual también se adquiere información a través del análisis radiográfico. Controlando la distancia entre máquina–obra–placa, es factible lograr imágenes en una escala muy similar a la real, es decir 1:1, pero todos aquellos elementos que no queden en contacto con la placa sufrirán cierto grado de deformación escalar a la hora de obtener la radiografía. Esto debe tomarse en cuenta al momento de la interpretación.

Dentro de los datos arrojados por el estudio sobre escultura en madera, está el poder distinguir el número y ubicación de los ensambles, muchas veces ocultos por la policromía u otros elementos decorativos, el número de elementos componentes de la imagen, o si está elaborada en un solo bloque, si posee la llamada “máscara” -parte de la talla del rostro que es unida posteriormente a la cabeza, una vez insertados los ojos de vidrio- lo que ayuda a ubicar temporalmente la obra; para el estado de conservación, es posible ubicar los faltantes tanto de soporte, como de base de preparación y/o policromía.

Incluso, en algunos casos, se ha podido apreciar la aplicación de huesos o dientes reales en la conformación de las figuras, tanto humanas como de algunos animales, o la inserción de rollos de papel con inscripciones [4].

### 3.3 Pintura de caballete

Como dato inicial, debemos señalar que fue en la pintura al óleo donde se aplicó por primera vez el análisis por rayos X en el patrimonio cultural, un año después de su descubrimiento, por el físico Wilhelm König [5].

En cuanto a la pintura sobre tabla, al igual que los anteriores, es posible conocer la técnica de conformación del soporte, sobre todo si se trata de distintos paneles unidos, pues permite observar la manera en que esto fue realizado. Además, también se llega a conocer el estado de conservación del mismo, siendo fácilmente apreciables los faltantes, fracturas y grietas, tanto de soporte como de los estratos superiores.

Si se logran manipular los parámetros de toma de radiografías, se pueden llegar incluso a observar los cambios en la composición de la obra pictórica, como los repintes, dependiendo del material con que hayan sido realizados. Por

ejemplo, el caso del óleo sobre tabla “San Miguel Arcángel” del municipio de Mexquitic de Carmona, en el estado de San Luis Potosí, México, permitió distinguir que en su armadura existían una serie de estrellas y un sol sobre ella (Fig. 1), mismos que fueron ocultos por una intervención posterior.



Figura 1. Detalle de la armadura de San Miguel con luz visible (izq.) y radiografía de la misma zona (der.). Fotografía: Álvaro Rivera González

En lo que a la pintura sobre tela concierne, el textil no es fácilmente observable a través de las radiografías, pero sí la influencia que este tenga sobre los estratos superiores, como la capa de preparación y la pintura, de las cuales también se permite evaluar su estado de conservación, especialmente en cuanto a daños mecánicos compete.

Al igual, los cambios en las composiciones suelen ser evidentes, sobre todo en policromías más antiguas, por el uso de pigmentos como el blanco de plomo para las encarnaciones y veladuras de luces. Tomando este dato como punto de partida, a continuación, abordamos el caso de un cuadro del Museo Casa de la Zacatecana, en la ciudad de Querétaro, México.

#### 3.3.1 Caso de estudio: Virgen de Guadalupe, Qro., México.

Durante la inspección previa a la intervención del óleo sobre tela “Virgen de Guadalupe con las Cuatro Apariciones” (Fig. 2) -datada a finales del siglo XVII o principios del XVIII- y al poder observarla a detalle en el taller de restauración, se detectó la presencia de un color subyacente, en zonas con pérdida de capa pictórica y abrasiones (Fig. 3) que en principio se creyó parte de la base de preparación (imprimatura) de la obra, o incluso veladuras que conformaban los matices de la misma, aunque esto podía ser descartado inmediatamente ya que los colores no coincidían con los de la imagen final. Continuando con el examen organoléptico bajo distintas luces, también se pudieron observar volumetrías con formas orgánicas debajo de la capa pictórica actual (Fig. 4), con lo que aumentaba la sospecha de una pintura debajo de esta. Cabe hacer mención que uno de los mayores problemas del acervo del museo es que no se ha encontrado, hasta el momento, algún registro que el coleccionista, el Lic. José Antonio Origel Aguayo, haya dejado sobre a quién, dónde o cómo adquirió las obras. Además, en cuanto a las pinturas sobre tela, el 90% no posee firma, pues están recortadas por los bordes, por lo que cualquier información que nos puedan aportar sobre su materialidad es de suma importancia.

Con base en lo anterior, se decidió llevar a cabo el análisis por imágenes RX para confirmar o no la presencia de otra pintura por debajo de la Virgen.



Figura 2. Imagen de la Virgen de Guadalupe. Fotografía: Rodrigo Villalobos Ruiz



Figura 3. Detalle de las pérdidas en la zona del ángel. Fotografía: Rodrigo Villalobos Ruiz



Figura 4. Detalle del resplandor de la Virgen. Fotografía: Rodrigo Villalobos Ruiz

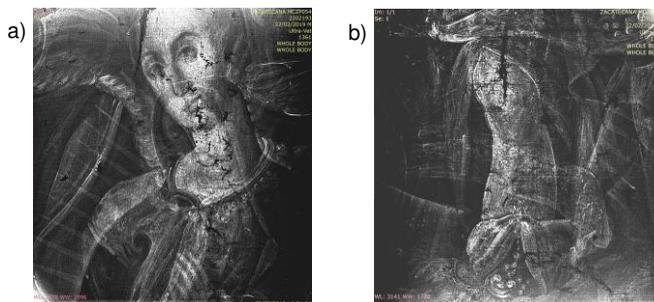


Figura 5. Imágenes radiográficas de la pintura. Fotografía: Rodrigo Villalobos Ruiz

En los talleres de los pintores era común la reutilización de los lienzos para volver a trabajar sobre ellos, y en ocasiones no se eliminaba la imagen anterior, sino que simplemente se volvía a pintar sobre ella, incluso sin una capa de preparación intermedia. La diferencia de tamaño entre los dos personajes nos indica que el soporte textil fue recortado de su formato original para crear la composición de la Virgen de Guadalupe con las Cuatro Apariciones (Fig. 6).

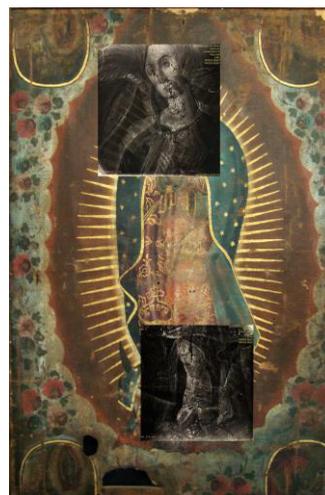


Figura 6. Imagen compuesta donde se puede observar la diferencia de dimensiones entre las figuras. Fotografía: Rodrigo Villalobos Ruiz.

El museo no cuenta con el equipo para realizar dicho estudio, y los recursos económicos no permitían ejecutar un análisis radiográfico del total de la obra, por lo que se seleccionaron dos áreas representativas y en las cuales se tenía la certeza de que existía pintura subyacente: el rostro de la Virgen y la zona del ángel y la luna. Para esto se utilizó un equipo portátil MY-D049R, con tubo de rayos X de 42 kHu y colimador de filtración de 1mm Al/70kV, sobre un chasis Flat Pannel Detector WIFI 1417V en sistema digital. Los parámetros empleados fueron 40 kV y 20 mA, con 0.05 segundos de exposición, a 90 cm de distancia entre la placa y el aparato.

Las imágenes radiográficas digitales obtenidas confirmaron la presencia de otra pintura que, al poseer mayor radiodensidad, se puede suponer la presencia de plomo en la conformación de las encarnaciones y como añadido en el resto de la policromía, en especial en las zonas claras (luces).

Se infiere que la figura subyacente se trata de un arcángel -probablemente San Gabriel- pues, además del rostro en la zona del propio de la Virgen y que dirige su mirada al espectador, es posible observar parte de un ala sobre su hombro derecho y detalles de las plumas (a). Rodeando el cuello de su vestidura se puede apreciar la decoración del mismo a manera de listones y pequellos brocados. La placa de la zona inferior corresponde a la rodilla y parte superior de la sandalia izquierda del arcángel (b), de la cual se distinguen los detalles como listones y piedras preciosas que la decoran (Fig. 5).

Sumado a esto, se logró obtener información sobre el estado de conservación de los estratos, siendo evidentes las zonas con abrasiones o pérdidas de policromía y base de preparación.

Para complementar los datos sobre la sucesión de capas pictóricas, posteriormente se realizó un análisis estratigráfico a través de microscopía óptica y SEM-EDX, donde se confirmó la ausencia de una base de preparación intermedia, y la presencia de pigmentos a base de plomo (albayalde y minio) en dos capas sucesivas de la pintura original, muy homogéneas, lo que se traduce en mayor radiodensidad, y cuyo registro resulta en una imagen tan clara como la obtenida en las radiografías.

## 4. CONCLUSIONES

Aunque las técnicas de análisis nos pueden arrojar una gran cantidad de datos por sí solas, como la radiografía, es necesario que el conocimiento adquirido se complemente con el número necesario de técnicas adicionales que permitan obtener un entendimiento global tanto de los objetos como de su devenir histórico.

En el caso de la Virgen de Guadalupe, esto se cumplió a través de un análisis estratigráfico y elemental que proporcionó información específica sobre la conformación tanto de la obra original -subyacente- y la que se observa actualmente. Sería muy conveniente el poder sumar otras técnicas no destructivas que nos arrojen mayores datos sobre el proceso creativo y sus cambios en el tiempo, como la reflectografía infrarroja.

Por último, con los casos anteriores, podemos advertir que la conservación-restauración se vale de las técnicas utilizadas por otras ciencias y las adapta para enriquecer el testimonio material del Patrimonio Histórico.

## REFERENCIAS

- [1] Martínez, Ma. J., y Sánchez-Mesa, D. (2009). *Historia y Teoría de la Conservación y Restauración Artística*. 3ª ed. Madrid: Tecnos.
- [2] Gayo, Ma. D. (2017). El Análisis de Materiales como Parte del Estudio Técnico de la Pintura. *Seminario Cátedra 2017 del Museo Nacional del Prado*. Madrid: Museo Nacional del Prado.
- [3] Gómez, Ma. L. (1998). *La restauración. Examen científico aplicado a la conservación de obras de arte*. 4ª ed. Madrid: Ediciones Cátedra.
- [4] Esquitín Lastiri, Ma., Silva Torres, J. E. (1983). *Escultura policromada: aspectos histórico, tecnológico, científico y su relación con la Restauración*. (Tesis de Licenciatura). Escuela Nacional de Conservación, Restauración y Museología - INAH. México.
- [5] Hannavy, J. (2013). *Encyclopedia of Nineteenth-Century Photography*. New York: Routledge. Recuperado de [https://books.google.com.mx/books?id=Kd5cAgAAQBAJ&pg=PA1104&lpg=PA1104&dq=Wilhelm+K%C3%B6nig+x+ray+oil+painting&source=bl&ots=etrOX97E8Q&sig=ACfU3U3X4Fw\\_duC7QORnEuvi rJS2Sd98Tg&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewj2x-](https://books.google.com.mx/books?id=Kd5cAgAAQBAJ&pg=PA1104&lpg=PA1104&dq=Wilhelm+K%C3%B6nig+x+ray+oil+painting&source=bl&ots=etrOX97E8Q&sig=ACfU3U3X4Fw_duC7QORnEuvi rJS2Sd98Tg&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewj2x-)



**Rodrigo Villalobos Ruiz** es Licenciado en Conservación y Restauración de Bienes Culturales Muebles, por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México, desde 2014, y se especializa en conservación de pintura sobre tela y conservación de colecciones en casas-museo. Actualmente es alumno del Máster Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universi-

dad Pablo de Olavide.