

MOLEQLA

n°
4
3

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
Rocío Escudero Ávila, Inés Maldonado Lasunción y Javier Revello Sánchez

Plantilla de la revista

Norberto Díaz Díaz

Editores de todas las secciones de la revista

MoleQla Ambiental	- Ana Martín Calvo
MoleQla Energía	- Juan Antonio Anta Montalvo
MoleQla Nutricional	- Gladys Margot Cahuana Macedo
MoleQla Patrimonio	- Rocío Ortiz Calderón
MoleQla Farmacéutica	- Matilde Revuelta González
MoleQla Nanotecnológica	- Ana Paula Zaderenko
MoleQla Biotecnológica	- Cristina Guillén Mendoza
MoleQla Celular	- Guillermo López Lluch
MoleQla Relatos	- Jose Manuel Vicent
MoleQla Informática	- Norberto Díaz Díaz
MoleQla Tierra	- Manuel Díaz Azpiroz
MoleQla Médica	- Juan Antonio del Castillo Polo
MoleQla Procesos	- Sara González García
MoleQla Deporte	- Alberto Grao Cruces
MoleQla Forense	- Antonio Aguilar García
MoleQla Instituto	- Almudena García Sánchez
MoleQla Educativa	- 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 19 de noviembre de 2021

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

Cuando a todos nos parece (o queremos que nos parezca) que estamos por fin saliendo de la pandemia, gracias entre otras muchas cosas a la eficacia de las vacunas (algo que todavía algunos ponen en duda), los grandes problemas de la humanidad vuelven a cobrar protagonismo: el cambio climático, el abastecimiento energético, la lucha contra el cáncer y las enfermedades degenerativas, la contaminación del medio ambiente, la automatización y la ciberseguridad.

MoleQla es una revista divulgativa. Sus valores son la promoción de la investigación científica, la educación superior y la generación de conocimiento, tanto para abordar nuestros problemas como sociedad avanzada como por el mero placer intrínsecamente humano de conocer, aprender y entender. Es por tanto también una revista *humanista*. El número que este otoño os traemos es una buena prueba de ello. El equipo editorial de MoleQla os invita a disfrutar con la lectura de los artículos que hemos seleccionado, y así continuar conociendo, aprendiendo y entendiendo. En definitiva, a seguir siendo humanos por encima de todo.



Juan Antonio Anta
Editor de la Revista MoleQla

ÍNDICE

1. *Moleq̃la Informática*

- 1.1. Máquinas virtuales, Docker y Kubernetes
- 1.2. Motores de persistencia
- 1.3. Computación cuántica y ciberseguridad

2. *Moleq̃la Biotecnológica*

- 2.1. Técnicas usadas para el genotipado de CNV y su contribución a la variabilidad genética

3. *Moleq̃la Farmacia*

- 3.1. La vacuna contra la cocaína, una realidad no tan lejana
- 3.2. Gas mostaza: la otra cara del enemigo
- 3.3. Organoides: potenciales herramientas biomédicas en miniatura

4. *Moleq̃la Nanotecnología*

- 4.1. Nanotecnología en el campo de la Ingeniería Tisular
- 4.2. Síntesis de nanopartículas de oro empleando bacteriófagos para la destrucción del biofilm

5. *Moleq̃la Patrimonio*

- 5.1. El perfume en Pompeya

Máquinas virtuales, Docker y Kubernetes

Alejandro Román Caballero

Resumen— En este artículo se hablará de que son las máquinas virtuales, como están evolucionando y que son las tecnologías de Docker y Kubernetes .

Palabras Claves— Virtualización, Docker, Contenedores, Kubernetes, Pods.

1. INTRODUCCIÓN

Este artículo sirve para que las personas que desconocen todavía estas tecnologías, se pongan al día, ya que la virtualización ha llegado para quedarse.

Este artículo explica la historia de cómo empezaron las máquinas virtuales y hasta dónde han llegado hoy en día. También describe la tecnología de las máquinas virtuales, y los programas como Docker o Kubernetes, donde se usa dicha tecnología.

Además, se detallan los usos prácticos sobre Docker y Kubernetes, con la incorporación de enlaces web que os llevarán a prácticas guiadas para probar estas tecnologías.

2. MÁQUINAS VIRTUALES

2.1. ¿Qué es una máquina virtual?

Para que se entienda de forma sencilla, una máquina virtual es un ordenador simulado, es decir, dentro de un ordenador podéis tener muchos ordenadores, los cuales se llaman máquinas virtuales. A la máquina virtual le podéis indicar diferentes especificaciones: la ram, la cpu, la interfaz de red, la memoria física y el sistema operativo que le vais a instalar. Estas especificaciones estarán limitadas a los recursos del ordenador donde se ejecuten.

2.2. Historia

El inicio de la máquina virtual comienza con el sistema VM/370 de IBM en el año 1972 [1]. En este tipo de sistema, las máquinas virtuales usaban el mismo hardware para cada máquina virtual, pero teniendo la posibilidad de elegir el sistema operativo que se vaya a ejecutar. A partir de aquí, se logra el principio de virtualización.

A lo largo de los años, se han ido modernizando el hardware y software, logrando así nuevas tecnologías de virtualización.

Las grandes compañías ya tienen sus propios servicios de virtualización en la nube.

Por ejemplo, Microsoft tiene una aplicación llamada Microsoft Azure, que nos permite desde un ordenador poder crear un ordenador virtual desde nuestra casa y con las especificaciones que queramos sin tener en cuenta nuestro propio hardware, porque usamos los recursos de Microsoft para crear dicha máquina [2].

Otro ejemplo sería la empresa de Amazon, que tiene una aplicación que es del mismo estilo, llamada Amazon EC2 [3].

2.3. Usos prácticos

Las máquinas virtuales tienen muchos usos, tantos como queráis darle a nivel informático. Por ejemplo, podéis hacer pruebas de rendimiento para ver cómo funciona un programa en diferentes sistemas operativos, o hacer una página web sin tener el servidor web en la máquina real.

3. DOCKER

3.1. ¿Qué es Docker?

Docker es una aplicación que permite, usando el propio hardware de la máquina real, crear contenedores, es decir, máquinas virtuales muy reducidas [4]. Por ejemplo, si necesitáis un servidor web, existen contenedores que ya proporcionan el servidor con la configuración preparada, pero sin programas innecesarios, es decir, solamente lo necesario para que se ejecute el servidor y podáis configurarlo.

3.2. Historia

Docker comenzó como un proyecto de software libre que Salomon Hykes empezó como proyecto interno dentro de dotCloud. El proyecto fue liberado en marzo de 2013 y en menos de 2 años consiguió ser uno de los proyectos estrella de GitHub. Actualmente empresas como: Red Hat , Google , Microsoft o IBM, contribuyen en el proyecto Docker [5].

Esta aplicación se está integrando en otras tecnologías, como, por ejemplo, OpenStack o Kubernetes, haciendo estas tecnologías muchos más completas [6],[7].

3.3. Usos prácticos

Hay muchos usos que podéis darle a esta tecnología, debido a que es muy útil y rápida comparada a otros programas de virtualización, ya que tira directamente de los recursos de nuestro propio ordenador. Con este programa podéis probar diferentes aplicaciones de forma rápida sin tener que instalar el sistema operativo desde cero. Por ejemplo: un wordpress, un servidor web como Apache2, etc [8], [9].

Además, podéis configurar la máquina que vayais a generar antes de que se inicie, es decir, unos comandos previos para que se configure solo y con ello os ahorre tiempo en el proceso.

Si queréis hacer una práctica con esta tecnología en vuestro ordenador, podéis visitar el enlace web que se indica a continuación: <https://www.alebuntu.es/manual-de-docker/>

4. KUBERNETES

4.1. ¿Qué es Kubernetes?

Kubernetes es un sistema de orquestación de contenedores, es decir, permite administrar los contenedores, aunque quien se encargará de crearlos principalmente es la aplicación de Docker [10].

Kubernetes permite escalarlos, crear servicios a partir de ellos y también hacer balanceo de carga o replicarlos, permitiendo así que las aplicaciones siempre estén activas y a máximo rendimiento.

4.2. Historia

Kubernetes fue fundado por Joe Beda, Brendan Burns y Creig McLuckie, a quienes se le unieron otros ingenieros de Google. Fue anunciado por Google a mediados de 2014. En Julio de 2015, fue liberada la versión Kubernetes v1.0 [11].

Más adelante, el equipo de Kubernetes desarrolló una tecnología en Canonical, para quien no tuviera los suficientes recursos para instalar un servidor de clúster de Kubernetes. Dicha tecnología se conocería como MicroK8s [12]. Esta aplicación permite administrar de una forma más cómoda los contenedores, ya que se puede utilizar una interfaz gráfica en vez de usar los comandos de Kubernetes[13].

4.3. Usos prácticos

Esta tecnología tiene muchos usos debido a que se ha implementado con otros programas, permitiendo darles mejor uso a los contenedores de Docker. Para ello, existen los pods, una terminología de Kubernetes que hace referencia a lo que será la configuración de los contenedores,

como la red a la que va a pertenecer o la composición de nuestro contenedor [14].

A continuación, se proporciona una práctica, dónde se explica cómo usar esta tecnología y los comandos que hay por encima.

Podéis acceder a dicha práctica a través del siguiente enlace web: <https://www.alebuntu.es/manual-de-microk8s/>

5. CONCLUSIONES

Esta investigación empezó con algo de base, debido a mis nociones de estas tecnologías tras haberlas usado en mi día a día. Por ejemplo, para hacer diferentes servidores, hacer aplicaciones web, Android o mi propio sistema operativo con Linux Scratch [15], [16].

Como hemos podido observar, la virtualización está al día en las grandes empresas, ya que facilita mucho el trabajo y ahorra bastantes recursos. Aunque la virtualización no tiene el mismo rendimiento que la máquina real, nos permite lograr grandes cosas y ahorrar mucho presupuesto en la maquinaria.

AGRADECIMIENTOS

Deseo dar las gracias a Juan Diego Pérez Jiménez y José Antonio Bernardo Salamanca, dos de mis profesores del Grado Superior de Administración de Sistemas Informáticos en Red, que me enseñaron muchas cosas sobre la informática y sobre este tipo de tecnologías. También quiero agradecer a Norberto Díaz Díaz por proponerme hacer un artículo respecto este tema.

REFERENCIAS

- [1] Web informativa sobre la historia de la primera máquina virtual <https://chsoosunal20181913034wordpress.wordpress.com/2018/05/19/máquinas-virtuales-vm-370/> (Enlace web)
- [2] Web de Microsoft sobre el producto de virtualización del catálogo de Azure <https://azure.microsoft.com/en-us/free/virtual-machines/> (Enlace Web)
- [3] Web de EC2 de Amazon <https://aws.amazon.com/es/ec2/> (Enlace Web)
- [4] Web Principal de Docker <https://www.docker.com/> (Enlace Web)
- [5] Web sobre Docker <https://es.slideshare.net/RalUnzu/docker-paradummies> (Enlace web)
- [6] Web Principal de Openstack <https://www.openstack.org/> (Enlace Web)
- [7] Web Instalación de Openstack paso a paso <https://alebuntu.blogspot.com/2019/07/manual-de-openstack-queens-para-ubuntu.html> (Enlace Web)
- [8] Web principal de Wordpress <https://wordpress.com/es/?aff=27964> (Enlace Web)

- [9] Web principal de Apache2 <https://httpd.apache.org/> (Enlace Web)
- [10] Web principal de Kubernetes <https://kubernetes.io/es/docs/concepts/overview/what-is-kubernetes/> (Enlace Web)
- [11] Wikipedia Kubernetes <https://es.wikipedia.org/wiki/Kubernetes> (Enlace web)
- [12] Web principal de MicroK8s <https://microk8s.io/> (Enlace Web)
- [13] Interfaz grafica de kubernetes <https://kubernetes.io/docs/tasks/access-application-cluster/web-ui-dashboard/> (Enlace Web)
- [14] Explicación sobre los pods de Kubernetes <https://kubernetes.io/es/docs/concepts/workloads/pods/pod/> (Enlace Web)
- [15] Web principal de Linux From Scratch <https://www.linuxfromscratch.org/> (Enlace Web)
- [16] Web de Wikipedia sobre Android <https://es.wikipedia.org/wiki/Android> (Enlace Web)



Alejandro Román Caballero estudiante de Ingeniería Informática en Sistemas de Información. Actualmente alumno de segundo año en la Universidad Pablo de Olavide. Así mismo, es el creador de <https://www.alebuntu.es> pagina de manuales sobre la informática.

Motores de persistencia

Juan Moreno Galbarro

Resumen- La gran mayoría de las aplicaciones están formadas por dos componentes principales que interactúan entre sí para cumplir las funcionalidades propuestas. En primer lugar, tenemos el programa propiamente dicho, que puede ser programado en un sinfín de lenguajes de programación. El segundo de estos componentes es la base de datos, que actúa como un disco duro, almacenando la información que será tratada en el programa. Estos componentes, trabajan en “lenguajes” diferentes, por lo que existe una incompatibilidad para comunicarse entre ellos, que determina la aparición de los motores de persistencia, estos actúan de “traductor” entre ambos modelos para que puedan comunicarse correctamente.

Palabras Claves— Programación, Base de datos, Persistencia, Relacional, Objetos, Mapeo, Modelo, Patrón, Registros

1. INTRODUCCIÓN

Cuando desarrollamos una aplicación software, uno de los primeros aspectos a tener en cuenta es la integración de una base de datos, la cual almacenará los datos usados en esta.

Hoy en día, la gran mayoría de las bases de datos son relacionales y trabajan con registros y la mayoría de los lenguajes de programación son orientados a objetos y trabajan con objetos. Es aquí donde se encuentra la incompatibilidad de ambos lenguajes para el tratamiento de la información.

Como una solución a esta incompatibilidad surge el concepto de mapeo objeto-relacional, O/R Mapping, o también llamado motor de persistencia. Se trata de un componente software destinado a traducir entre los dos formatos de datos: de registros a objetos y de objetos a registros, para poder establecer conexión entre ambas partes sin perder las ventajas de cada uno de los dos modelos.

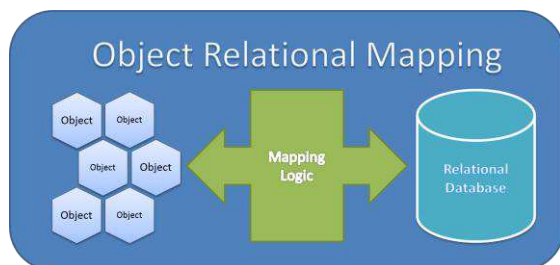


Fig. 1. Esquema de una aplicación informática formada por un lenguaje orientado a objetos, un motor de persistencia, y una base de datos relacional.

De esta manera, conseguimos leer, escribir y borrar objetos en el almacenamiento persistente que tenemos (nuestra base de datos relacional).

Hoy día encontramos varias herramientas para poder crear esta capa, algunas incluso de software libre, aunque hay programadores que prefieren crearla ellos mismos.

2. MODELOS USADOS

2.1. Modelo orientado a objetos

Este modelo nace de la idea de asemejar lo máximo posible el lenguaje de programación al mundo real, facilitando su uso tanto a programadores como a usuarios finales de las aplicaciones basadas en este modelo.

Esta se basa en la creación de objetos ya existentes en el mundo real, y sus comportamientos. Para ello, hace uso de sus cuatro principales conceptos clases, atributos, objetos y método, aunque el concepto principal son los objetos, que serán los “datos” que este modelo maneje.

Hoy en día la gran mayoría de lenguajes usados son orientados a objetos, aunque podemos encontrar algunos que usan otros paradigmas de programación. Cabe destacar que muchos de estos intentan imitar y usar el modelo orientado a objetos asimilándose lo máximo a esta estructura.[9]

2.2. Modelo Relacional

A diferencia de la programación, la gestión de los datos, y el área de las bases de datos han mantenido un modelo firme, es el llamado “modelo relacional”.[1]

Con este modelo podemos construir bases de datos de una o más tablas que serán estructuradas en registros(filas) y campos(columnas).[3]

Como hemos comentado anteriormente, su incompatibilidad con el modelo orientado a objetos viene dada por los datos que esta maneja, llamados “registros”, que almacenan los datos y características pertenecientes a una misma entidad de la vida real, agrupados en tablas.

3. ANTES DE LOS ORM

La solución más obvia para resolver este problema de incompatibilidad entre lenguajes de programación y bases de datos antes de que nacieran los motores de persistencia era adaptar uno de los dos componentes al modelo usado por el otro, es decir, o teníamos un lenguaje de programación que tratara con datos relacionales, o una base de datos orientada a objetos.[6]

3.1. Lenguajes de programación con datos relacionales

En esta opción, la base de datos y el programa utilizaban el mismo formato de datos, el registro y compartían modelo, el relacional.

Esta forma sigue siendo utilizada, aunque en muy pocas ocasiones.

El gran problema de esta arquitectura es que perdemos las grandes ventajas que nos da la programación orientada a objetos, es decir, facilidad a la hora de programar, flexibilidad, fácil mantenimiento, etc.

Además, el código necesario para usar datos relacionales es bastante más complejo y difícil de mantener. [6]

3.2. Bases de datos orientadas a objetos

Existe un tipo de base de datos llamadas bases de datos orientadas a objetos que al contrario que las relacionales, que trabajan con registros, trabajan con objetos usando algún tipo de lenguaje de programación para realizar las consultas.[6]

Estas bases de datos nos serían útiles si queremos programar en un lenguaje orientado a objetos sin necesidad de usar un motor de persistencia que actúe de "traductor" entre ambos modelos.

Con este modelo, toda la información está disponible en el objeto, ya que sus datos quedan agrupados juntos, en lugar de distribuidos en tablas como pasaba en el modelo relacional. Al igual que el modelo orientado a objetos y a diferencia del modelo relacional, estas bases de datos guardan los comportamientos que tendrán cada uno de los objetos existentes.

El uso de estas bases de datos está poco extendido, y la comunidad que se encarga de desarrollar y mejorar este modelo es relativamente pequeña, por lo que muchos programadores optan por utilizar bases de datos relacionales, que están más generalizadas y mejor documentadas.[7]

Al igual que los lenguajes de programación con datos relacionales, si usamos las bases de datos orientadas a objetos en lugar de un motor de persistencia, perderíamos las ventajas que nos muestran las bases de datos relacionales como pueden ser la portabilidad, el fácil desarrollo, la experiencia y la gran documentación que existen sobre este modelo, etc.[9]

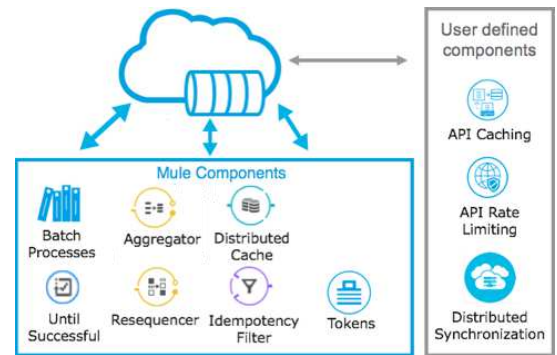


Fig. 2. Esquema de una base de datos orientada a objetos y los componentes que esta usa. [9]

4. MAPEO OBJETO-RELACIONAL

El mapeo objeto-relacional, también conocido como ORM (Object Relational Mapping) permite la conexión entre las estructuras de bases de datos relacionales y los lenguajes de programación orientados a objetos. [2]

Este permite convertir los datos de nuestro modelo orientado a objetos, es decir, nuestros objetos en un formato correcto para poder guardarlos en una base de datos, a esto lo llamamos mapeo.

Para ello, crea una base de datos virtual donde se guardan estos datos y quedan vinculados a nuestra base de datos real, este proceso es llamado persistencia.

De todo esto se encargan los famosos "motores de persistencia".[4]

4.1. Patron DAO

Un patrón es una solución general a un problema común ya planteado. Este en particular nos ayuda bastante a la hora del mapeo objeto-relacional.

El patrón DAO es reconocido como el patrón más importante del acceso a datos y es de gran utilidad a la hora de implementar el mapeo objeto-relacional en nuestra aplicación. [5]

Este nos propone separar la lógica de negocio y el acceso a datos, encapsulando la lógica necesaria para que la información pueda moverse desde la lógica hacia la base de datos y viceversa.

La capa DAO contiene todas las operaciones CRUD (create, remove, update y delete).

Por lo general se tiene un DAO para cada tabla que tengamos en la base de datos.

De esta forma, la capa que contiene la lógica de negocio solo se preocupa por la lógica de negocio y utiliza el DAO (que pasará anteriormente por el motor de persistencia) para interactuar con la base de datos

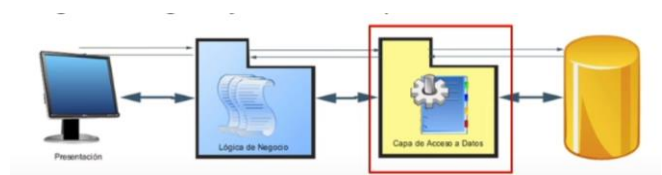


Fig. 3. Flujo de información entre lógica de negocio y base de datos, usando el Patrón DAO

4.3. Motores de persistencia más usados

Dependiendo del lenguaje en el que programemos nuestra aplicación encontraremos numerosos Motores de persistencia para poder incluirlos en esta, la gran mayoría de software libre, a continuación, algunos de los más usados.[11][2]

	Java	Ruby	.Net	PHP	Python	Software libre
Hibernate	✓	X	X	X	X	✓
Doctrine	X	X	X	✓	X	✓
ActiveRecord	X	✓	X	✓	X	✓
NHibernate	X	X	✓	X	X	✓
Cayenne	✓	X	X	X	X	✓

Fig. 4. Tabla de motores de persistencia y lenguajes de programación en los que pueden ser usados.

4.4. Ventajas a la hora de usar ORM

Son muchas las ventajas que nos proporciona el uso de un ORM frente a la adaptación de uno de los dos modelos al otro, como se programaba antes de la aparición de estos.[8]

En primer lugar, cabe destacar que eliminamos la necesidad de tener que escribir código SQL para tratar los datos, por lo tanto, eliminamos la complejidad que esto supone, aparte se disminuye el trabajo a realizar en la parte de desarrollo ya que no tenemos que encargarnos de la conversión de datos.

Se disminuye la posibilidad de ataques de inyección SQL o similares, que es un aspecto muy a tener en cuenta actualmente.

Aumenta la reutilización del código, y con esto la mejora del mantenimiento y de la eficiencia de este.

Pero el mayor aspecto a tener en cuenta es el uso de las ventajas de ambos modelos, sin tener que prescindir de las de uno, como pasaba anteriormente al uso de los ORM.[10]

4.4. Aspectos a tener en cuenta

Además de las múltiples ventajas que nos ofrecen, debemos tener en cuenta varios aspectos que pueden influir a la hora de usar los motores de persistencia.

En primer lugar, tanto el desarrollo como el aprendizaje de estos puede ser bastante complejo, esto puede conllevar un retraso en el tiempo del desarrollo del proyecto.

Es necesario tener aplicada una buena arquitectura de nuestra aplicación, para poder incorporar los motores de persistencia a ella.

Debemos tener en cuenta que estamos añadiendo una capa más al sistema y que esto nos puede influir negativamente a la hora de tener entornos con gran carga, ya que podría reducir el rendimiento de nuestra aplicación.[10]

5. CONCLUSIONES

La gran mayoría de lenguajes de programación usados hoy en día son orientados a objetos y las bases de datos, relacionales. No podemos prescindir de ninguna de estas partes ya que tienen una gran integración y soporte en el mercado actual.

A pesar de los inconvenientes que el mapeo objeto-relacional pueden ocasionar, si se utilizan de forma adecuada, pueden mejorar notablemente nuestra aplicación, tanto en rendimiento como en complejidad a la hora de desarrollarla.

Cada vez el manejo de datos es más importante en nuestras aplicaciones y es por ello, por lo que debemos simplificar, y mantener seguro el acceso a estos, por lo que sería impensable una aplicación que no hiciera uso de estos motores de persistencia.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a sus profesores Norberto Díaz-Díaz y Jose Antonio Lagares Rodríguez por su docencia en la asignatura de Ingeniería del Software II del 2º curso del Grado de Ingeniería Informática de Sistemas de Información.

REFERENCIAS

- [1] Edgar Frank Codd, "A Relational Model of Data for Large Shared Data Banks"
- [2] Web de Deloitte.
<https://www2.deloitte.com/es/es/pages/technology/articles/que-es-orm.html>
- [3] Revista académica de la Universidad de Costa Rica.
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/7719>
- [4] Revista telemática CUJAE.
<https://revistatelematica.cujae.edu.cu/index.php/tele/article/view/23>
- [5] Web de la Junta de Andalucía.
http://www.juntadeandalucia.es/servicios/madeja/contenido/libro-pautas/13#Uso_del_patron_DAO
- [6] Web de programacion.net
https://programacion.net/articulo/motores_de_persistencia_231
- [7] Web de ionos.es
<https://www.ionos.es/digitalguide/hosting/cuestiones-tecnicas/base-de-datos-orientada-a-objetos/>
- [8] Web de la Academia.edu.
https://www.academia.edu/9610912/Estudio_comparativo_de_sistemas_de_mapeo_objeto_relacional_desarrollados_en_plataformas_Open_Source
- [9] Web de Graph Everywhere,
<https://www.grapheverywhere.com/bases-de-datos-orientadas-objetos/>
- [10] RootniteBlog, <https://blog.rootnite.com/opinion/que-es-un-orm-deberia-utilizarlo-en-mis-proyectos/>
- [11] <https://programarfácil.com/blog/que-es-un-orm/>



Juan Moreno Galbarro es Técnico Superior en Administración de Sistemas Informáticos en Red. Actualmente cursa el grado de Ingeniería Informática en Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Computación cuántica y ciberseguridad

Alejandra Acosta Álex y Javier Cordero Luna

Resumen—En este artículo se tratarán dos temas fundamentalmente, la computación cuántica por un lado y la ciberseguridad y la implicación de la computación cuántica en ésta.

Como se expondrá, existen formas de hacer inservible o poco práctica tanto la encriptación RSA como AES, y esto supone una grave amenaza para las compañías y comunicaciones, y un gran desafío para las corporaciones encargadas de asegurar la transmisión y recepción de datos de la manera más segura posible.

Palabras Claves— Computación cuántica, ciberseguridad, algoritmo, Shor, Grover.



1. INTRODUCCIÓN

En 1995 el matemático Peter Shor publica Polynomial-Time Algorithms for Prime Factorization and Discrete Logarithms on a Quantum Computer, donde presenta el conocido Algoritmo de Shor, el cual permite factorizar en números primos un número N en tiempo $O((\log N)^3)$. Esto sentaría una base para que en 2001 se factorizase el número 15 usando un ordenador cuántico de 7 qubits. Este hito no solo tuvo trascendencia por lo obvio, si no por lo que llevaba implícito, pues la factorización de un número N es la llave principal para atacar el cifrado RSA.[1] Con esto y las recientes noticias en las que Google asegura haber conseguido la supremacía cuántica con el Sycamore, el cual está provisto de 53 qubits (casi 8 veces más de los empleados en 2001), queda claro que el futuro de la ciberseguridad y la criptografía, diseñadas para funcionar en computación clásica, queda en una posición delicada, pues es necesario que se desarrollen nuevas tecnologías de modo que podamos estar a salvo de intrusiones indeseadas en un futuro que parece cada vez más cercano.

una vez intentemos observarlo, colapsará a uno de los estados elementales [1].

Estos estados elementales, siguiendo la notación de Dirac, serán 0 o 1, es decir

$$\begin{aligned} 0 &= 1 * |0\rangle + 0 * |1\rangle = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix} \\ 1 &= 0 * |0\rangle + 1 * |1\rangle = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix} \end{aligned} \tag{1}$$

Podríamos generalizar esto para cualquier alpha y beta tal que

$$1 = \alpha * |0\rangle + \beta * |1\rangle = \begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \end{pmatrix} \tag{2}$$

Donde α y β son las amplitudes de probabilidad, que tienen como condición que

$$|\alpha|^2 + |\beta|^2 = 1 \tag{3}$$

2. INTRODUCCIÓN MATEMÁTICA Y A LA CIBERSEGURIDAD

2.1. Introducción matemática

Mientras que un bit tiene únicamente 2 posibles estados (0, 1), un qubit puede estar en una proporción de ambos, entrando en un estado de superposición que,

Alejandra Acosta Álex (alejandra.acosta.alex@gmail.com) y

Javier Cordero Luna (corderojavier17@gmail.com). Universidad Pablo de Olavide

Se trata de los módulos ya que α y $\beta \in \mathbb{C}$. Recordemos que los números reales son un subconjunto de los complejos, por lo que podemos observar que esta condición se cumple para los estados elementales anteriores.

Igual que ocurre con la superposición en física con, por ejemplo, los electrones, no podemos observar este estado en superposición, sino que este colapsará en algún momento y pasará a ser el estado básico $|0\rangle$ o $|1\rangle$, con la probabilidad $|\alpha|^2$ de colapsar en 0 y una probabilidad $|\beta|^2$ de colapsar en 1.

Otros qubits importantes son los equipotentes, que son

$$|+\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} * |0\rangle + \frac{1}{\sqrt{2}} * |1\rangle = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$$

$$|-\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} * |0\rangle - \frac{1}{\sqrt{2}} * |1\rangle = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$$

(4)

Y así, podemos extrapolarlo a cualquier número n de qubits, donde los estados elementales representarán un vector de ceros salvo en la posición que indique el valor del qubit (módulo 2), y dicho vector tendrá una dimensión \mathbb{C}^{2^n} .

A continuación, se explicarán las puertas lógicas cuánticas más utilizadas y sencillas que nos podemos encontrar para un único qubit.

- a. Puerta X. Es el equivalente a la puerta NOT en computación clásica. La matriz que la representa es

$$\begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} \quad (5)$$

Esta puerta lo que hará será intercambiar los valores α y β . [2]

- b. Puerta $\sqrt{\text{NOT}}$. Esta puerta es muy similar a la anterior, pero en su primera aplicación resultan estados en superposición y no necesariamente los qubits elementales. Su matriz es

$$\begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}^{\frac{1}{2}} = \begin{pmatrix} \frac{1}{2} + \frac{i}{2} & \frac{1}{2} - \frac{i}{2} \\ \frac{1}{2} - \frac{i}{2} & \frac{1}{2} + \frac{i}{2} \end{pmatrix} \quad (6)$$

- c. Puerta Hadamard (H). Surge a partir de una simplificación de la puerta anterior. Esta puerta realiza una rotación de $\pi/2$ radianes. Si se aplica sobre los estados $|0\rangle$ y $|1\rangle$ obtendremos los estados $|+\rangle$ y $|-\rangle$ respectivamente. La matriz generadora es

$$\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ 1 & -1 \end{pmatrix} \quad (7)$$

Finalmente, a partir de las características anteriores, llegamos a la conclusión de que, para puertas lógicas cuánticas que solo aplican a un qubit, geoméricamente son rotaciones dentro de la Esfera de Bloch. Esto se debe a que nuestro qubit debe cumplir siempre con la condición de probabilidad. Además, esto nos lleva a que estas puertas sean unitarias, ya que son las únicas que mantienen la norma. Estas matrices tienen como característica principal que

$$U^+ * U = U * U^+ = I \leftrightarrow (U^+ = U^{-1}) \quad (8)$$

Este tipo de matrices tienen unas características concretas en sus autovalores y autovectores.

- $U|x\rangle = \lambda|x\rangle$ donde λ es un autovalor de U y tiene un valor $e^{i\vartheta}$, donde ϑ es un ángulo en radianes. Es decir, como se expuso anteriormente, se trata de una rotación de ϑ radianes dentro de nuestra esfera. [3]
- Si existen dos autovalores distintos para una matriz concreta, sus correspondientes autovectores son ortogonales. [3]

2.2. Introducción a la ciberseguridad

El objetivo de este estudio es comprender cómo todos estos conocimientos matemáticos anteriormente expuestos se pueden aplicar al campo de la seguridad informática.

La ciberseguridad, según el diccionario de léxico de Oxford[4], es "Conjunto de elementos, medidas y equipos destinados a controlar la seguridad informática de una entidad o espacio virtual", o lo que es lo mismo, maneras de salvaguardar, en el ámbito de la computación, información privada.

Esta rama de la informática, aunque en constante evolución, se ha visto condicionada de alguna manera por las limitaciones en procesamiento de los ordenadores clásicos. Tanto es así que, por ejemplo, las encriptaciones RSA se tenían y se siguen teniendo como estándar para algunos de los sistemas de comunicación más importantes de hoy en día a nivel civil.

Los ordenadores cuánticos son aquellos computadores que, a diferencia de los clásicos, trabajan y hacen cálculos probabilísticos sobre qubits. En primer lugar, debemos marcar la gran diferencia entre ambos sistemas. El ordenador clásico se basa en cálculos deterministas, mientras que el cuántico se basa en probabilidades.

Existen tres tipos de criptografías: simétrica, asimétrica e híbrida.

Por un lado, la simétrica usa una clave para cifrar y descifrar el mensaje, por lo que esta clave ha tenido que ser compartida mediante un canal seguro. Por ejemplo, si Alice y Bob necesitan comunicarse de manera segura deben poseer ambos la misma clave que habrán compartido en persona o mediante cualquier

otro canal libre de intrusos. Posteriormente, si Alice quiere enviar un mensaje a Bob, lo codificará usando la clave, la misma que aplicará Bob a la hora de decodificarlo. De esta manera si hubiera una 3ª persona intentado acceder al contenido, se toparía con una cadena codificada de manera que resulte incomprensible.

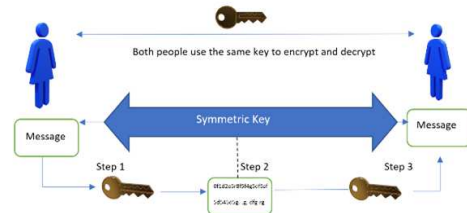


Fig. 1. Diagrama de funcionamiento de encriptación simétrica.

Como vemos, todo este proceso comienza cuando se comparte la clave que se usará para encriptar y descifrar la información. A continuación, el emisor (Alice) mandará el mensaje cifrado. Este pasará por canales sin la certeza de si son seguros o no, y finalmente llegará al receptor (Bob), que convertirá lo que ha recibido en el mensaje original aplicando nuevamente la clave.

Por otro lado, nos encontramos con la encriptación asimétrica, la cual nace en 1976 ante la necesidad de superar los inconvenientes que presenta la simétrica (dificultad a la hora de guardar y distribuir las claves privadas). Este tipo de encriptación funciona con dos claves, una pública y otra que es privada. Lo que se hace es codificar el mensaje enviado con la clave pública, de manera que cualquiera puede ver el mensaje cifrado y sabría cuál es la clave usada, pero solo se puede ver el contenido original al aplicar una llave privada que el receptor tiene. Un claro ejemplo de este tipo de encriptación es la RSA, muy extendida y usada a lo largo de la historia de la ciberseguridad.

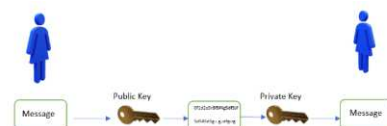


Fig. 2. Diagrama de funcionamiento de encriptado asimétrico.

Por último, tenemos la criptografía híbrida, la cual tiene lo mejor de la simétrica y de la asimétrica para lograr una comunicación segura. En ese caso lo que se hace es que Alice codifica el mensaje que quiere enviar con una clave simétrica, también cifrada esta vez con el sistema asimétrico, de manera que a Bob lo que le llega es el mensaje y la llave cifrados. Finalmente, lo que el receptor debe hacer es descifrar la clave simétrica con su clave privada (asimétrica) y con esta sacar el mensaje en claro que le envía el emisor.

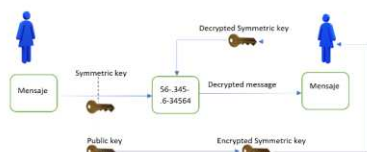


Fig. 3. Diagrama de funcionamiento de encriptado híbrido.

Gracias a todo esto, lo que hace poco más de un lustro se antojaba inalcanzable ahora es una realidad, y con cada avance que se logra en este ámbito parece que tenemos más cerca el uso habitual de estos nuevos ordenadores.

3. ALGORITMO RSA

La encriptación RSA se basa en la factorización de un número entero N en números primos.

Para la explicación matemática, partiremos del problema que, dado un número N , queremos encontrar dos primos que al multiplicarlos obtendremos N . Esto para la computación clásica podría tardar mucho tiempo, y para resolverlo, los ordenadores cuánticos entrarán en escena.

Este problema se genera ya que, dentro de la codificación RSA, si se consiguen encontrar estos dos primos, descubrimos la clave secreta que nos abre las puertas a entender la información que se está transmitiendo.

Tenemos las variables N , p y q . Elegimos dos primos para p y q respectivamente. Por ejemplo, por los números $p = 2$ y $q = 11$, tal que $N = p \cdot q$, es decir, $N = 22$.

A continuación, calcularemos los valores que tiene una variable z tal que $z = (p-1) \cdot (q-1)$, en nuestro caso $z = 10$. El siguiente paso debe ser elegir un número k que sea co-primo de z (que no sea divisible por z y que sea menor que este). Nuestras posibilidades son el 3 o el 7, ya que el 2 y el 5 son divisores del 10. Elegiremos una de ellas, en nuestro ejemplo, elegiremos el 3, ya que los cálculos se simplificarán bastante. Por tanto, nuestra clave pública será $(22, 3)$.

Nuestra clave privada será una j tal que $k \cdot j = 1 \pmod{10}$. Para ello, debemos encontrar un valor tal que:

$$(k \cdot j) \% 10 = 1$$

En nuestro caso, tomaremos $j = 7$, consiguiendo así que

$$(3 \cdot 7) \% 10 = 1 \quad (21 \% 10)$$

Esta j será nuestra clave privada, que no debe revelarse.

Para cifrar un mensaje, debemos aplicar la siguiente fórmula:

$$P^k = E \pmod{N}$$

Donde P es el mensaje que queremos enviar y E es el mensaje cifrado.

Si nosotros queremos mandar el mensaje $P = 13$ aplicaremos lo siguiente:

$$13^3 = E \pmod{22} \rightarrow E = 2197 \% 22 = 19$$

El descifrado conociendo la clave privada j es sencilla, solamente hay que aplicar la fórmula

$$E^j = P \pmod{N} \rightarrow 19^7 = 893871739 \rightarrow P = 13$$

Sin embargo, para aquellos que no conocen el valor de j y quieren descifrar este código, tanto con buenas como con malas intenciones, necesitarán del algoritmo de Shor para poder obtenerlo. Si además desean hacerlo en un tiempo razonable (un código más complejo, con un número mucho más grande puede tardar años en descifrarlo con la computación clásica actual) necesitaremos de la ayuda de la cuántica.

El proceso descrito anteriormente era asequible en cuanto a tiempo de computación para claves que no superasen los 1024 bits, pues a partir de esa longitud

el tiempo de factorización se eleva hasta $1,3 \cdot 10^{26}$ operaciones totales (unos 65 millones de veces el tiempo requerido para una clave de 512 bits) [5]. El problema llega cuando se teoriza y se implementa el Algoritmo de Shor, el cual, y gracias a los qubits, es capaz de factorizar una clave de más de 2048 bits en unas ocho horas[6]. De esta forma, se genera un nuevo problema para los organismos que velan por la seguridad, pues deben encontrar la forma de, en primer lugar, no dar acceso a ordenadores cuánticos a riesgos en potencia, y en segundo lugar, descubrir cómo parar las amenazas que con estos avances puedan ir llegando.

El poder de la computación cuántica no se queda solo ahí. Haciendo mediciones con propiedades cuánticas se puede llegar a desarrollar nuevos algoritmos que simulen el comportamiento humano de manera que se puedan optimizar distintos aspectos de nuestras vidas. También, y claro está, tanto poder computacional servirá para investigar, desarrollar y mejorar nuevos sistemas de encriptación, de manera que lo que hoy parecen amenazas que pueden poner en jaque todo nuestro sistema, se quede en amenazas y no en algo de facto.

4. ALGORITMO DE SHOR

Como ya se ha dicho anteriormente, el algoritmo de Shor es, sin duda, la principal amenaza para todos los sistemas y comunicaciones basados en la encriptación RSA.

Para explicar el algoritmo teóricamente, supongamos que dos personas se quieren comunicar con el código de encriptación tipo RSA, y hay una tercera persona que quiere enterarse de estos mensajes, pero desconoce el valor de la clave privada j . Los pasos que tendrá que realizar el computador, independientemente de su característica cuántica o no, serán muy similares.

Si buscamos encontrar los dos números que, al multiplicarlos entre sí, obtenemos N , dependiendo de cuán grande sea ese número puede necesitar décadas para resolver el problema. Sin embargo, no tenemos por qué encontrar esos dos factores siempre, sino que podemos buscar algún número que comparta con N algún factor, es decir,

$$N = a \cdot b$$

$$g = a \cdot c$$

Encontrar un número que comparta un factor con otro es bastante sencillo gracias al algoritmo de Euclides, por lo que simplemente el segundo valor vendrá dado por la división de N/a , siendo a el factor común que hemos encontrado. Sin embargo, el problema lo tendremos al decidir qué número g comparte el valor adecuado con N para que podamos encontrar el número común, que es donde entra el algoritmo de Shor.

Para ello, haciendo uso del teorema de Euler

$$A^{\varphi(n)} = 1 \pmod{B} \leftrightarrow A^g = m \cdot B + 1 \quad (9)$$

Con esto, podemos extrapolarlo a nuestro problema y realizar las siguientes operaciones

$$\begin{aligned} g^p &= m \cdot N + 1 \leftrightarrow g^p - 1 = m \cdot N \\ &\leftrightarrow (g^{\frac{p}{2}} + 1) \cdot (g^{\frac{p}{2}} - 1) \\ &= m \cdot N \end{aligned} \quad (10)$$

Por tanto, en nuestra última ecuación hemos encontrado finalmente una ecuación que se asemeja a la inicial que buscamos, $N = a \cdot b$, aunque ahora nuestra N está multiplicada por un factor m , lo que no debe suponer un problema.

No todos los números g son candidatos viables para realizar esta tarea. Sin embargo, matemáticamente hablando con menos de 10 intentos tendremos unas probabilidades muy elevadas de que así sea, siendo 10 intentos un número muy bueno para números muy grandes.

Además, se nos presenta el siguiente problema. Elegir el número p que se utilizará para este cálculo. Para ello, haremos uso de la computación cuántica. Un ordenador cuántico podrá realizar varios cálculos a la vez, pero solamente obtendremos un output de una de las soluciones de forma aleatoria, con las probabilidades concretas descritas en apartados anteriores.

Para ello, podremos intentar que el ordenador calcule tantas $|x\rangle$ tal que el resultado sea $|x, g^x\rangle$ y posteriormente que esto lo transforme en $|x, r\rangle$, siendo r el resultado de $g^p = m \cdot N + r$. Aquí, debemos hacer una tercera transformación, ya que no nos interesan los valores tales que $r \neq 1$.

Sabiendo que los módulos de los números son periódicos, podemos obtener que

$$g^{x+p} = m_2 * N + r \quad (11)$$

Siendo r un número distinto de 1.

La demostración de esto sería que

$$\begin{aligned} g^{x+p} &= g^x * g^p \\ &= (m_1 * N + r)(m_2 * N + 1) \\ &= (m_1 m_2 N + m_1 + r m_2) N + r \end{aligned} \quad (12)$$

Es decir, el módulo seguirá siendo r . Por tanto, si encontramos la frecuencia con la que ocurre que el resto es r , podremos obtener p . Al realizar los cálculos para obtener un número r , aunque lo que nosotros observemos sea que el ordenador ha devuelto un único valor, como este viene de la superposición de distintos valores cuyo r es el mismo, podemos continuar los cálculos con únicamente estos valores, desechando el resto.

El último paso será aplicar las transformaciones cuánticas de Fourier para poder obtenerlo. Estas transformaciones tienen una parte matemática muy importante, pero a grandes rasgos lo que hacen es devolver la fase en la que se encuentra el número indicado. Si realizamos esta operación varias veces, podremos encontrar un factor común, el periodo, del cual podemos sacar la frecuencia ya que $f = p^{-1}$

Una vez llegados a este punto, hemos obtenido el valor p y podremos finalizar nuestro descifrado.

Para clarificar todos estos conceptos matemáticos anteriormente descritos, vamos a explicar un ejemplo, cuya implementación se encuentra en Qiskit.[7]

En primer lugar, tenemos que encontrar la función periodo en el algoritmo de Shor para luego determinar la solución usando la estimación de fase cuántica en el operador unitario $U|y\rangle \equiv |a \cdot y \bmod N\rangle$.

En la implementación en Qiskit que llevan a cabo en el notebook disponible en IBM Quantum Lab tenemos la resolución para $a = 7$ y $N = 15$. Hay que tener los circuitos para U , donde $U|y\rangle \equiv |a \cdot y \bmod 15\rangle$. Para crear U^x simplemente repetiremos el circuito x veces. Usaremos la función `c_amod15`, la cual nos dará la puerta de control de U para a , las veces que le pasemos por parámetro mediante `power`.

Se han utilizado 8 qubits de conteo y se "recicla" el circuito para la Transformación cuántica de Fourier. Con esto, se obtendrá el circuito cuántico necesario.

A partir de aquí, se muestran las mediciones que el circuito arroja. Estos resultados corresponden a las siguientes mediciones de fase.

El siguiente paso será usar el módulo de fracciones para convertir un real en tipo *Fraction*. Esta nos devuelve dos autovalores con el resultado correcto, $r=4$. El resto de valores no son apropiados. Esto puede deberse a que $s=0$ o a que s y r no son co-primos y lo que está devolviendo son factores de r . Si obtenemos este resultado, simplemente habría que repetir el experimento hasta que nos dé un resultado apropiado para r .

Como vemos, la creación de U^{2^j} puertas repitiendo U no crece polinómicamente, si no exponencialmente con j . Aunque calculando $U^{2^j} \bmod N$ conseguimos que crezca polinómicamente. Eficientemente es posible, y los ordenadores clásicos podrían usar el algoritmo de Exponenciación binaria[8] para calcular un exponencial, pero nosotros vamos a usar otra implementación ya que los circuitos necesarios no son sencillos y representan un cuello de botella en el algoritmo de Shor.

Aunque hay varios pasos antes de usar el resultado del periodo de Shor, nosotros vamos a situarnos en el

peor escenario. Supongamos el caso en que N es producto de dos primos. Por lo que tendremos $N = 15$.

Lo primero es elegir un numero aleatorio entre 1 y $N-1$ y posteriormente comprobaremos que no es un factor no trivial de N .

Una vez lo hemos comprobado usaremos el algoritmo de búsqueda de órdenes de Shor para $a = 7$ y $N = 15$. La fase que midamos será s/r donde $ar \bmod N = 1$ y s es un entero aleatorio entre 0 y $r-1$.

Una vez obtenida la r , deberíamos ser capaces de encontrar un factor de N , haciendo uso de la ecuación 10, siendo r la p de dicha ecuación.

En caso de que r no sea impar no podemos avanzar y deberemos encontrar otro valor.

Hay una gran probabilidad de que el M.C.D de N y tanto de $g^{p/2} - 1$ o $g^{p/2} + 1$ sea un factor propio de N [5]. Así que ya tendríamos los factores primos de N .

5. ALGORITMO DE GROVER

Otro algoritmo que sin duda pone en el centro del debate la ciberseguridad con la entrada de la computación cuántica es el algoritmo de Grover [10], el cual permite romper el algoritmo del cifrado AES mediante bruteforce.

El algoritmo de Grover tiene muchas variantes, pero en este trabajo se mencionará el modelo básico.

Supongamos que disponemos de una cadena de N elementos, siendo $N = 2^n$ y n el número de qubits del circuito. Este algoritmo se basa en encontrar una cadena tal que el único bit activo sea la solución real del problema. Para ello, tendremos diversos elementos.

En primer lugar, tenemos el vector a buscar, $|w\rangle = (0, 0, \dots, 1, 0, \dots, 0)^t$ y el vector $|s\rangle = (1, 1, \dots, 1, 1)^t * 1/(\sqrt{N})$ [10]. Necesitaremos a su vez un oráculo para nuestro estado $|w\rangle$, y un amplificador, que vienen representados por

$$\begin{aligned} \langle U_w | &= \langle I | - 2 |w\rangle \langle w| \\ \langle U_a &= 2 |s\rangle \langle s| - 2 \langle I | \end{aligned} \quad (13)$$

La función principal del oráculo será conseguir que, desde un estado de superposición, el qubit o conjuntos de qubits válidos tendrán un valor igual al anterior, pero en sentido negativo. A continuación, se aplica un amplificador, que hará que aquellos valores negativos se vuelvan a cambiar de signo, pero esta vez con un valor mayor del que tenían anteriormente. Al realizar este cambio, el resto de qubits deben reducir su valor, ya que se debe cumplir la condición de probabilidad. [9]

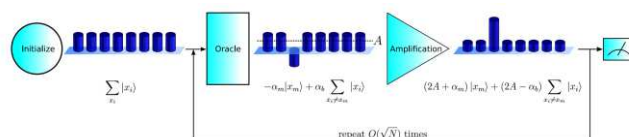


Fig. 3. Diagrama descripción del funcionamiento del Algoritmo de Grover

Finalmente, tras realizar esto un número \sqrt{N} [11] veces, se puede asegurar con una probabilidad de acierto cercana a 1 que se ha encontrado la solución esperada.

A continuación, se comentará un ejemplo, también disponible en la página web de IBM Quantum Lab, en el que, a modo representativo y didáctico, consiguen resolver un sudoku de dimensión 2×2 con este método.

En primer lugar, debemos saber cuáles son las restricciones que se nos presentan en este problema. Ninguna columna ni fila puede contener el mismo número dos veces o más. Lo que debemos hacer es asignar a cada celda una variable para posteriormente sacar un circuito que nos dé una salida con los resultados.

El primer paso es convertir el problema en un circuito. Se representan nuestras restricciones de la siguiente manera $v_0 \neq v_1, v_2 \neq v_3, v_0 \neq v_2, v_1 \neq v_3$. Como estamos comparando estados clásicos vamos a poner este conjunto de comparaciones como lista de cláusulas.

Asignamos el valor de cada variable a un bit de nuestro circuito. Para comprobar las restricciones usaremos puertas XOR.

A partir de aquí, obtendremos *Output* que indicará si las posibles combinaciones están dentro de las condiciones iniciales del problema. Posteriormente, el circuito compara si ambas entradas son iguales y lo guarda en la salida. Para comprobar cada restricción se repite el circui-

to para cada par que hay en *clause_list* y almacenar la salida en un nuevo bit.

El estado final que devuelve, C_x serán todos 1 si los valores de V_x son soluciones del ejercicio. Para terminar nuestro circuito comprobador tendremos que poner un bit que sea 1 si y solo si todas las restricciones se satisfacen.

El circuito toma como entradas los valores iniciales de V_x , y todos los demás bits deberán estar inicializados a 0. Una vez ejecutado el circuito, el estado de *out0* nos dirá si son soluciones o no. *out0* = 0 significa que no son solución, y *out0* = 1 significa que sí lo son.

A continuación, vamos a convertir el circuito en un oráculo de Grover usando el *phase kickback*.

Se calcula el oráculo a partir de los conceptos matemáticos descritos con anterioridad. Como condición, debemos asegurarnos de que los bits en el segundo registro siempre vuelven a |0000) después de los cálculos.

Finalmente tenemos el algoritmo completo, con el oráculo ya implementado, que es básicamente para obtener las soluciones de un sudoku.

Si ejecutamos el código en el simulador e interpretamos los resultados observamos que tenemos dos mediciones. Por lo que 0110 y 1001 serán nuestras dos soluciones al problema.

Este ejemplo tan simple quizá no parezca tener mayor trascendencia, pero si aumentamos el tamaño de la matriz problema y de los circuitos podremos atacar, mediante fuerza bruta, los algoritmos de cifrado tipo AES, los cuales hoy no parecen tener amenazas pero que, cómo hemos podido ver, con ordenadores cuánticos suficientemente avanzados pueden verse comprometidos.

5. CONCLUSIONES

Este trabajo ha demostrado que es crucial conocer las matemáticas que engloban un cierto problema para poder realizar las distintas prácticas informáticas de importancia, como es en el área de la computación cuántica.

Por otro lado, parece relevante recalcar la importancia de conocer las posibles vulnerabilidades en ciberseguridad antes de que los ordenadores cuánticos entren en el mercado, solucionando así futuros problemas de seguridad general.

REFERENCIAS

- [1] Qiskit, "7. Shor's Algorithm I: Understanding Quantum Fourier Transform, Quantum Phase Estimation - Part 1," 2020. <https://www.youtube.com/watch?v=mAHC1dWKNYE&list=PLOFEBzvS-VvrXTMy5Y2lqmSaUjfnhvBHR&index=9>
- [2] P. K. Roy, Quantum Logic Gates. 2020.
- [3] J. E. G. Cornejo, "Conceptos Matemáticos Básicos de Computación Cuántica," 2021. https://www.docirs.cl/math_computacion_cuantica.asp.
- [4] "Definición de ciberseguridad." <https://www.lexico.com/es/definicion/ciberseguridad>
- [5] R. Durán Díaz, L. Hernández Encinas, and J. Muñoz Masqué, "ATAQUE A DES Y MÓDULOS FACTORIZADOS DE RSA." [Online]. Available: <https://core.ac.uk/download/pdf/36032262.pdf>.
- [6] C. Gidney and M. Ekerå, "How to factor 2048-bit RSA integers in 8 hours using 20 million noisy qubits," arXiv. May 23, 2019, Accessed: Apr. 20, 2021. [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/1905.09749>.
- [7] IBM, "Shor's Algorithm. Qiskit Implementation," IBM Qiskit Webpage. <https://qiskit.org/textbook/ch-algorithms/shor.html>
- [8] P. E. Black, "Repeated Squaring (Algorithm)," 2013. <https://xlinux.nist.gov/dads/HTML/repeatedSquaring.html>.
- [9] IBM, "Grover's Algorithm. Qiskit implementation," IBM Qiskit Webpage. <https://quantum-computing.ibm.com/lab/files/qiskit-textbook/content/ch-algorithms/grover.ipynb>.



Alejandra Acosta Álex. Estudiante de segundo curso en el Grado en Ingeniería informática en sistemas de la información en la Universidad Pablo de Olavide y estudiante del Grado de Matemáticas por la UNED.



Javier Cordero Luna. Estudiante de segundo curso de Ingeniería Informática en Sistemas de Información en la UPO (Sevilla).

Técnicas usadas para el genotipado de CNV y su contribución a la variabilidad genética

Carlos Salameh Borrero

Resumen— Los CNV se definen como pérdidas y ganancias a gran escala de fragmentos de ADN. Este tipo de variaciones estructurales conforman una de las principales clases de variación genética y pueden considerarse como un importante motor de evolución.

Abstract— CNVs are defined as large-scale gains and losses of DNA fragments. These types of structural variations make up one of the main classes of genetic variation and can be considered as an important engine of evolution.

Palabras Claves— SNP(snp), CNVs, CNVRs, Variabilidad genética, PCRq.

1. INTRODUCCIÓN

Se conoce como variación del número de copias o CNV (del inglés “Copy Number Variation”) al polimorfismo que existe en los cromosomas al poder encontrarse segmentos de tamaño igual o superior a una kb duplicados o delecionados al compararse con un genoma de referencia. Estos cambios en el número de copia pueden cambiar la expresión de los genes incluidos en las regiones de número de copias variables conocidas como CNVR (Copy Number Variation Region), permitiendo niveles mayores o menores de transcripción o bien interrumpiendo la expresión de dichos genes. Para que se produzca un cambio en el número de copias se necesita que se dé un cambio en la estructura del cromosoma, uniéndose dos secuencias de ADN que están separadas. [1]

Estas Secuencias son las que se conocen como LCRs (del inglés, “Low Copy Repeats”) o SD (del inglés, “Segmental Duplications”). Son regiones con una longitud mayor o igual a una kilobase y con al menos 90% de identidad que aparecen repetidas aproximadamente unas dos veces en el genoma. Estas regiones parece que se localizan preferentemente cerca de los centrómeros y de los telómeros. Estas regiones pueden estar en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes.

Pese a que normalmente se considera que todos los miembros de una misma especie contienen la misma cantidad de material hereditario en sus células, lo cierto es que en múltiples regiones génicas los genomas presentan variabilidad en el número de copias de algunos segmentos del ADN. Un caso especial de CNV, son las CNV multialélicas, que se presentan en un número de estados o alelos mayor de dos. Las CNV multialélicas son difíciles de analizar debido a algunas limitaciones técnicas: la incapacidad de discriminar entre el número de estados consecutivos (por ejemplo, nueve o diez) mediante técnicas comunes como los microarrays o la PCR cuantitativa rutinaria y el amplio

rango de números de copias con los que se pueden analizar en el genoma, desde dos hasta doce o más copias. [2]

2. PROCEDIMIENTO EN EL ESTUDIO DE CNV.

2.1. Recolección de muestras y genotipado

Para la recolección de la muestra se puede realizar de diversas maneras, siendo la más común la extracción de raíces del cabello, sangre o semen siguiendo la legislación de la UE. Para el genotipado de las muestras al igual que la extracción, se pueden realizar de varias formas, la más comunes en la actualidad son el genotipado por medio de Illumina BEADSTUDIO (2.0), Método Illumina HD genotype array (HD arrays) (figura 1) o Chips de ADN basados en SNPs. [3]

Otra vía para el genotipado es el uso de la técnica array de CGH (Comparative Genomic Hybridation) (figura 2), que usa el diseño dye-swap en loop. Con loop se refiere a que el genoma de cada individuo se hibrida tras haber sido fragmentado y marcado con fluoróforos con el de otros especímenes en lugar de con un genoma de referencia[3]. Esto nos permite mejorar la eficiencia del experimento y nos permite encontrar CNVs que quizás no detectaríamos si al comparar dos vacas, ambas presentaran el mismo CNV. Dye-swap hace referencia a que cada hibridación se hace dos veces invirtiendo el marcaje para así evitar el sesgo que introducen los fluoróforos. De esta manera se obtiene los resultados por medio del análisis de intensidad de fluorescencia de cada fluorocromo y se representa gráficamente. [4,5]

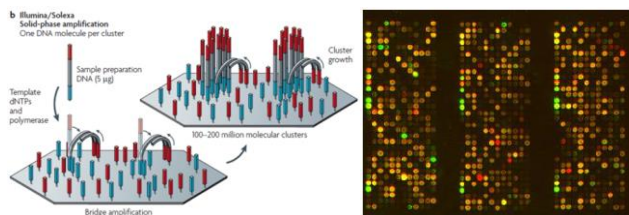


Figura 1, izquierda: Ejemplo gráfico de Illumina, estrategias de inmovilización de plantillas. Se compone de dos pasos básicos: cebado inicial y extensión de la plantilla monocatenaria, de molécula única, y amplificación puente de la plantilla inmovilizada con cebadores inmediatamente adyacentes para formar agrupaciones. Se muestran tres enfoques para inmovilizar moléculas de una sola molécula en un soporte sólido: inmovilización mediante un cebador. [6] **Figura 2**, derecha: Ejemplo de Array CGH. Esta imagen representa la caracterización de reordenamientos genómicos utilizando un microarreglo genómico. La hibridación genómica comparativa basada en matrices, o matriz CGH, permite escaneos de todo el genoma para detectar reordenamientos cromosómicos con una resolución muy mejorada, hasta cientos de bases, o más de mil veces mejor que un cariotipo. [7]

2.2. Identificación de CNV

El software PennCNV para identificar las CNV. El algoritmo del modelo de Markov oculto (HMM) empleado en PennCNV incorpora múltiples parámetros, como la intensidad de la señal total o LRR (del inglés, "leucine-rich repeat"), los valores de la relación de intensidad alelica BAF (del inglés, "B allelic frequency") de cada marcador para cada individuo y la frecuencia de población de SNP (del inglés, "Single nucleotide polymorphism"). [8] Los valores de LRR y BAF de cada marcador para cada muestra se generan a partir del paquete de software Illumina Genome Studio utilizando el archivo de agrupamiento predeterminado (Illumina Inc, Estados Unidos). La identificación de CNV se puede realizar mediante un script de Python personalizado. [9]

2.3. Validación usando PCRq

La validación de los CNV identificados se debe llevar a cabo por PCRq (PCR cuantitativo en tiempo real) de esta forma se excluyen errores. Con la PCRq se puede realizar en un ensayo de un paso o de dos pasos (Figura 3). Los ensayos de un solo paso combinan la transcripción inversa y la PCR en un solo tubo y tampón, utilizando una transcriptasa inversa junto con una ADN polimerasa. La PCRq de un paso solo utiliza cebadores específicos de secuencia. En los ensayos de dos pasos, los pasos de transcripción inversa y PCR se realizan en tubos separados, usando tanto primers específicos de secuencias como al azar, con diferentes tampones optimizados, condiciones de reacción y estrategias de cebado [10].

2.4. Diseño de Primer

Los cebadores de PCR para el paso qPCR de RT-qPCR deberían diseñarse idealmente para abarcar una unión exón-exón, con uno de los cebadores de amplificación que potencialmente abarcan el límite real exón-intrón (Figura 4). Este diseño reduce el riesgo de falsos positivos de la amplificación de cualquier ADN genómico contaminante, ya que la secuencia de ADN genómico que contiene el intrón no se amplificaría.

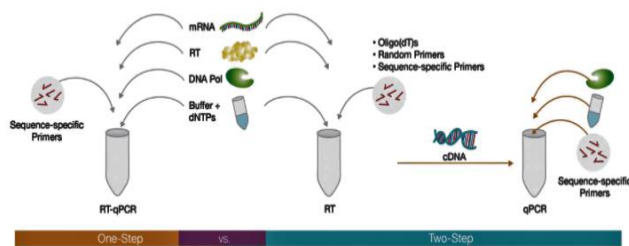


Figura 3: One-Step vs. Two-Step RT-qPCR. Imagen obtenida de la web *Thermo Fisher Scientific*. [11]

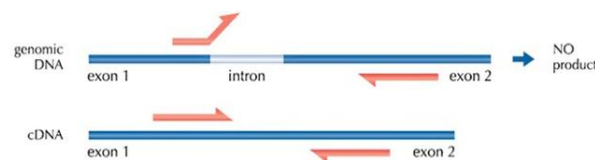


Figura 4: Diseño del cebador para el paso PCRq. Imagen adaptada de la web *Thermo Fisher Scientific*. [11]

3. RESULTADOS

Los resultados de diversos estudios indican que las CNV afectan ampliamente a los genes y a su expresión, siendo la principal fuente de variación de la dosis génica en humanos (hasta un 88% de la variabilidad). Dicha variación, además, influye fuertemente en los niveles de expresión. [12]

Respecto al papel de estas variantes y su asociación genética con algunas enfermedades, se ha reportado que la inserción-delección, GCTGT→A (el alelo A es de riesgo) localizada en la región 3' UTR del gen TNFSF13B (el cual codifica para la citocina factor activador de células B) confiere riesgo para desarrollar esclerosis múltiple y LES (Lupus eritematoso sistémico) en pacientes de diversos países de Europa. Es importante mencionar que la variante A de la inserción-delección GCTGT→A genera un mRNA corto que evita ser inhibido por un microARN (un regulador negativo de la expresión de diversos mRNA a nivel postranscripcional), lo cual lleva a mayor producción de citocina factor activador de células B soluble en estos pacientes, causando susceptibilidad para su desarrollo. [12]

Por otro lado, la inserción CTTTA localizada en la región 3' UTR del gen LEPR está asociada con aumento de peso corporal, mientras que la inserción de 45 pb localizada en la región 3' UTR del gen UCP2 (que codifica para una proteína desacoplante que actúa como un transportador mitocondrial y regulador de la homeostasis energética y termogénesis) ha sido asociada con alteraciones en el índice de masa corporal y el peso corporal después de la alimentación. Otro estudio evaluó un grupo de CNVs en diversos genes de pacientes con cáncer colorrectal; se detectó que estas variantes en los genes ACE, UCP2, TYMS, IL4, NFKB1, CASP8, TP53, HLAG, UGT1A1 y SGSM3 están asociadas con susceptibilidad y otros rasgos clínicos. Otras pequeñas inserciones y deleciones localizadas en los genes

PPP3R1, PARP1, premiR3131, COL1A2, HLA-G han mostrado asociación con susceptibilidad para enfermedad arterial coronaria, melanoma, carcinoma hepatocelular, osteoporosis y LES, respectivamente. [13]

No obstante, hay otros importantes estudios de CNVs en bovinos que confirman que los CNV también están implicados de manera positiva en el organismo. Atendiendo a la naturaleza de los genes encontrados en las regiones con CNV, se comprobó que estos genes participaban, en su mayoría, en la respuesta ambiental, en funciones sensoriales o en el sistema inmunológico, en concreto, genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Esto se debe a que al modificar el número de copias de los genes afectados se traduce, por ejemplo, en una mejor adaptación al ambiente o en un aumento

de alguna molécula del sistema inmune y, así, una mejor defensa a agentes patógenos. Por lo tanto, son modificaciones que se han seleccionado positivamente en la evolución. Como se ha mencionado antes, los genes altamente conservados, como son aquellos que codifican a las proteínas de producción de la leche o proteínas relacionadas con la lactancia, no se encuentran en estas regiones, debido a que las modificaciones en dichos genes se han seleccionado negativamente.[14]

4. APLICACIONES FUTURAS

Algunos ejemplos de aplicaciones serían la optimización ganadera, como la mejora en la producción de leche o carne, favorecer la adaptación del ganado a nuevos ambientes haciéndolo más inmunocompetente y capaz de resistir estreses, o incluso hacerlo más fértil para así obtener una mayor cantidad de descendientes.

En humanos, por ejemplo, se han detectado CNVs en pacientes con autismo, deficiencias mentales o incluso comportamientos de autolesión, por lo que podría plantearse su utilización como marcadores para detectar este tipo de condiciones. Por último mencionar que estas técnicas serían de gran utilidad en la medicina personalizada con fines terapéuticos.

5. CONCLUSIONES

Lo primero que hay que destacar es que los genes que encontramos en regiones afectadas por CNVs son más propensos a sufrir cambios no sinónimos, es decir, cambios no silenciosos y, si además tenemos en cuenta que la mayoría de estos genes estarán relacionados con la respuesta inmune y la adaptación ambiental, podríamos establecer que las CNVs son motores de evolución. Veámoslo con un ejemplo: si tenemos un organismo en el que un gen relacionado con el sistema inmune, como uno de producción de interferón, sufriera una CNV, en este caso pongamos que una duplicación, dicho organismo sería más inmunocompetente que el resto de miembros de su especie, lo que le conferiría una ventaja frente a estos. Si además tenemos en cuenta que, tras la duplicación, podría sufrirse un cambio no sinónimo, lo que significaría que la proteína para la que dicho gen codificase tuviera una cadena aminoacídica

ligeramente distinta, esta nueva proteína puede ser clave para una mejor adaptación de nuestro organismo a un ambiente nuevo, por lo que sería positivamente seleccionada por la evolución y transmitida a sus descendientes. Así pues, este tipo de variaciones estructurales podrían considerarse como un importante motor de evolución.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer a sus profesores en el grado de biotecnología de la universidad Pablo de Olavide de Sevilla así como a su familia y compañeros.

REFERENCIAS

- [1] Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006 Feb;7(2):85-97. doi: 10.1038/nrg1767. PMID: 16418744.
- [2] Bretani G, Rossini L, Ferrandi C, et al. Segmental duplications are hot spots of copy number variants affecting barley gene content. *Plant J.* 2020;103(3):1073-1088. doi:10.1111/tpj.14784
- [3] Zhu, C., Fan, H., Yuan, Z., Hu, S., Ma, X., Xuan, J., et al. (2016). Genome-wide detection of CNVs in Chinese indigenous sheep with different types of tails using ovine high-density 600K SNP arrays. *Sci. Rep.* 6:27822. doi: 10.1038/srep27822
- [4] Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., et al. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444,444–454. doi: 10.1038/nature05329
- [5] Zhang, Q., Ma, Y., Wang, X., Zhang, Y., and Zhao, X. (2014). Identification of copy number variations in Qinchuan cattle using BovineHD Genotyping Beadchip array. *Mol. Genet. Genomics* 290, 319–327. doi: 10.1007/s00438-014-0923-4
- [6] Metzker, M. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31–46 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- [7] Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, et al. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol.* 1999;52(5):243-251. doi:10.1136/mp.52.5.243
- [8] Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant SF, Hakonarson H, Bucan M. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res.* 2007 Nov;17(11):1665-74. doi: 10.1101/gr.6861907. Epub 2007 Oct 5. PMID: 17921354; PMCID: PMC2045149.
- [9] Sasaki, S., Watanabe, T., Nishimura, S., and Sugimoto, Y. (2016). Genome-wide identification of copy number variation using high-density single-nucleotide polymorphism array in Japanese Black cattle. *BMC Genet.* 17:26. doi: 10.1186/s12863-016-0335-z
- [10] Bae, J. S., Cheong, H. S., Kim, L. H., NamGung, S., Park, T. J., Chun, J.-Y., et al. (2010). Identification of copy number variations and common deletion polymorphisms in cattle. *BMC Genomics* 11:232. doi: 10.1186/1471-2164-11-232

[11] <https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>

[12] Steri M, Orrù V, Idda ML, Pala M, Sidore C, Faà V, et al. Overexpression of the cytokine BAFF and autoimmunity risk. *N Engl J Med*. 2017; 376:1615-1626.

[13] Marques D, Ferreira-Costa LR, Ferreira-Costa LL, Correa RDS, Borges AMP, Ito FR, et al. Association of insertion-deletions polymorphisms with colorectal cancer risk and clinical features. *World J Gastroenterol*. 2017;23:6854-6867

[14] Paudel, Y., Madsen, O., Megens, H.-J., Frantz, L. A. F., Bosse, M., Bastiaansen, J. W. M., et al. (2013). Evolutionary dynamics of copy number variation in pig genomes in the context of adaptation and domestication. *BMC Genomics* 14:449. doi: 10.1186/1471-2164-14-449



Carlos Salameh Borrero

Estudiante de último curso (4^º) del grado en Biotecnología en la universidad Pablo de Olavide, de Sevilla. Estudiante con intereses por la biotecnología en el ámbito sanitario así como en el campo de la industria agroalimentaria y farmacéutica.

La vacuna contra la cocaína, una realidad no tan lejana

Laura Arbeloa Gómez, Jaime Álvarez Vidal

Resumen—La cocaína supone, más allá del abuso recreativo, un problema social. Es por ello que, en las últimas décadas se ha visto necesario un plan de acción contra este problema. Las vacunas antidroga han sido positivamente valoradas en los últimos años como una potencial terapia para ayudar a las personas que tienen graves problemas de drogodependencia. En especial, los ensayos de una vacuna contra la cocaína están adquiriendo una gran relevancia y a pesar de que su desarrollo está pasando por dificultades metodológicas, parece tener un futuro prometedor, que podría suponer un alivio para muchas familias y poblaciones afectadas por todos los problemas sociales y económicos que hay tras la cocaína.

Palabras Claves— Adicciones, Cocaína, Drogas, Tratamiento, Vacunas antidroga.

* Los autores han contribuido en igual medida a la elaboración de este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

El abuso de sustancias psicotrópicas constituye un problema social de gran escala y que afecta a gran parte del mundo. La distribución de estas sustancias ilegales, entre ellas la cocaína, se ha convertido en uno de los mercados negros más potentes y fomenta a las víctimas de adicción a llevar a cabo actividades ilegales. Esto afecta tanto a los adictos como a todo el entorno que les rodea. Problemas familiares o pérdidas de empleo son solo algunas de estas consecuencias negativas [1].

En España, aproximadamente uno de cada diez individuos afirma haber consumido alguna vez cocaína en polvo, este porcentaje ha aumentado en los últimos años, situándose la edad media de inicio de consumo en torno a los 21 años. Este consumo se encuentra más extendido en hombres que en mujeres [2]. Estos datos muestran un alarmante problema, a pesar de su ilegalización, el porcentaje de consumidores es amplio. Debido a la gran morbilidad que esto puede conllevar, se ha intentado abordar el problema desde distintas perspectivas médicas. Las vacunas han sido típicamente empleadas para tratar enfermedades infecciosas, sin embargo, gracias al conocimiento inmunológico y neuroquímico de su funcionamiento surgió una posible estrategia en su empleo para otro tipo de afecciones como pueden ser, el Alzheimer, la obesidad o las adicciones.

Alrededor de los años 1970, ante un aumento del consumo de drogas ilegales en Estados Unidos, se comenzaron a estudiar modificaciones en sustancias adictivas que pudieran desencadenar una respuesta inmunitaria, estableciéndose en 1974 el Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas (NIDA). Las vacunas que proponían se basaron en que las drogas de abuso conducen a la recompensa y el refuerzo al ingresar rápidamente al cerebro y unirse a los receptores neuronales en vías cerebrales muy específicas. Se propuso que los anticuerpos tipo IgG específicos de antígeno generados a partir de la vacunación capturen el fármaco antes de que pueda cruzar la barrera hematoencefálica, evitando así la activación de las vías de refuerzo [3].

Para ello se basaron en los estudios de Spector y Parker, realizados a finales de la década de 1960, que, a partir de morfina, desarrollaron un fármaco que generó anticuerpos en roedores, dando moléculas demasiado grandes para atravesar la barrera hematoencefálica [4]. Sin embargo, en ese momento no se reparó en la importancia de estos hallazgos y el trabajo se detuvo [5].

En los años 1990, la alta tasa de recaídas entre los consumidores de drogas hizo necesario el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento y se reanudaron los intentos de desarrollar vacunas. Se ha investigado para el desarrollo de vacunas frente a la nicotina, los opioides, la metanfetamina y la cocaína. En este artículo se tratará de explicar cómo es posible el desarrollo de esta última vacuna además de abordar los avances en la investigación de este tratamiento.

2. VACUNAS ANTI-COCAÍNA

2.1. La cocaína

La cocaína o benzoilmetilecgonina ($C_{17}H_{21}NO_4$) [Fig.1] es un alcaloide tropánico, que se presenta comúnmente como un polvo blanco cristalino. Su masa molecular es de 303,353 g/mol y su punto de fusión es de 98 °C. Su síntesis se realiza a través de la hoja de coca natural utilizando adyuvantes o mediante síntesis química *de novo* a partir de otros alcaloides. En 1859, se aisló el ingrediente activo en coca, nombrado cocaína, y se consideró un fármaco benigno hasta el comienzo del siglo XX, cuando se reconocieron los aspectos negativos de su uso. Las vacunas anti-cocaína comenzaron a fabricarse en la década de 1990.

En 1995 se desarrolló la primera vacuna contra la cocaína, sintetizando un hapteno con una proteína conectora. Cuando se administró cocaína a ratas vacunadas, se observó supresión de la actividad locomotora y se encontraron niveles bajos de cocaína en el cerebro [6].

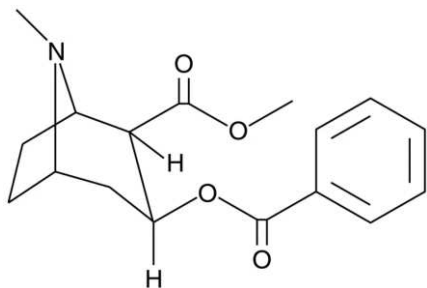


Fig 1. Molécula de cocaína.

2.2. Tratamientos actuales

Los avances en la comprensión de la neurobiología de la adicción a la cocaína han permitido el desarrollo de diversos medicamentos que han demostrado efectos prometedores en ensayos clínicos, agonistas de la dopamina, medicamentos glutamatérgicos y medicamentos colinérgicos como la galantamina [7].

A pesar de esto, a día de hoy la FDA (Food and Drug Administration) no ha aprobado ningún tratamiento para el abuso de cocaína, lo que deja a los pacientes únicamente con la terapia psicológica, que consiste en combinar terapias grupales e individuales, para poder superar este trastorno drogodependiente [8].

2.3. Farmacocinética de la cocaína

Algunas de las cuestiones de mayor importancia para el desarrollo de vacunas anti-cocaína, son la vida media del anticuerpo después de unirse en circulación y la farmacocinética del fármaco. Se ha demostrado que la vida media de un anticuerpo unido a pequeñas moléculas de hapteno, como las drogas, no se ve afectada en un modelo animal [1]. Con respecto a la vida media del fármaco en sí, la cuestión es más compleja y depende de las propiedades y metabolitos específicos de la sustancia [9].

Para la cocaína, la vida media de la droga en circulación permanece casi igual en presencia o ausencia de anticuerpos, esto sugiere que su metabolismo en el torrente sanguíneo no se inhibe al unirse al anticuerpo. Todo esto deriva en que la cocaína sea un objetivo potencialmente ideal para una vacuna, ya que los anticuerpos podrían unirse de nuevo al fármaco activo una vez que se elimine la dosis inicial [1]. Sin embargo, una característica crítica de la farmacodinámica de la cocaína es que su abuso depende de la rápida ocupación de los transportadores de dopamina en el sistema nervioso central, lo que aumenta rápidamente la dopamina mesolímbica e induce una acumulación de dopamina en los centros de recompensa del cerebro [10].

2.4. Estudios preclínicos y ensayos clínicos realizados hasta el momento.

La administración de un inmunocombinado fármaco-proteico que activa el sistema inmunológico puede generar anticuerpos altamente específicos que minimicen eficazmente la penetración del fármaco en la barrera hematoencefálica y, por tanto, las concentraciones en el sitio de acción. La evaluación preclínica de las vacunas

para la adicción a la cocaína ha aludido a los posibles éxitos de este enfoque [11]. La principal vacuna en la que se han desarrollado ensayos clínicos se denomina TA-CD, basada en la toxina B del cólera.

En el ensayo de fase I, fue capaz de inducir anticuerpos específicos contra la cocaína en los sujetos vacunados. Además, se informó de una atenuación en su experiencia subjetiva y en la euforia experimentada ante el consumo de cocaína. Los únicos efectos adversos encontrados fueron unos pocos sujetos con taquicardia leve, temperatura elevada o hipertensión. Al comparar la vacunación con dosis bajas y altas se observó una menor tasa de recaída en el consumo en los sujetos con la dosis alta (89% frente a 43%).

En el ensayo de fase II se utilizaron cinco inyecciones de 360 µg, aproximadamente un tercio de los sujetos alcanzó niveles de anticuerpos suficientes para bloquear la mayoría de las dosis de cocaína esperadas. Este grupo anticuerpos altos presentó más orina libre de cocaína que el grupo de anticuerpos bajos o los grupos tratados con placebo. El nivel de anticuerpos permaneció elevado durante 3 meses después de la última vacunación y no surgieron problemas de seguridad [3].

El ensayo clínico de fase III, un estudio multicéntrico, doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo y de 24 semanas de duración, incluyó a 300 personas dependientes de la cocaína. Se midió la cantidad de anticuerpos anti-cocaína IgG presentes en la orina, y se observó que no había diferencia significativa entre los pacientes a los que se les había administrado la vacuna y los tratados con placebo, además, ambos grupos lograron niveles similares de abstinencia. No se registró ningún efecto adverso grave relacionado con la vacuna. Esto demostró que, a pesar de ser segura, su eficacia era escasa.

Dado el fracaso de este último ensayo, fue necesario rediseñar la formulación de la vacuna existente para aumentar la inmunogenicidad y conseguir un tratamiento eficaz ante la adicción a la cocaína mediante inmunoterapia [12].

2.5. Ensayos clínicos futuros

Ante el fracaso de los ensayos de la vacuna anterior, se comenzó a desarrollar una nueva vacuna, denominada dAd5GNE, basada en un análogo de la cocaína (GNE) unido covalentemente a las proteínas E1a, E1b y E3 de adenovirus serotipo 5, además se le incluyó en gen *LacZ* para permitir una evaluación rápida y sensible de la infectividad viral en modelos animales. La vacuna dAd5GNE ha sido probada en ratones y en primates no humanos, obteniéndose en ambos casos unos niveles de anticuerpos de IgA elevados, y además se comprobó que había una disminución de los niveles de cocaína en el cerebro de dichos animales y que también se veía reducida la hiperactividad del sistema locomotor inducida por el abuso de cocaína. También se observó que la reducción de cocaína en el cerebro era similar en los modelos que recibieron una única dosis diaria y aquellos que recibieron

tres [13]. Ante estos resultados, en el año 2016 comenzó en Estados Unidos un ensayo clínico para evaluar la seguridad y la eficacia de esta vacuna. Se trata de un estudio de fase I doble ciego, controlado con placebo. Promete provocar una respuesta inmunológica, creando así anticuerpos anti-cocaína que evitan que esta llegue al cerebro. Se prevé que este ensayo finalice para el año 2025 [14].

3. CONCLUSIONES

La cocaína es actualmente un problema acuciante en la mayor parte del mundo, tanto por el abuso de la sustancia en sí como por la importancia socio-económica y la delincuencia que se le asocia. Así, es necesario tomar medidas para combatir su abuso y poder disminuir su impacto negativo. Las vacunas anti-cocaína se presentan como una oportunidad clave para disminuir el abuso de la cocaína y sus consecuencias, así como, incluso, si es posible, llegar a conseguir una vacuna preventiva que pudiera aplicarse a los grupos de población de riesgo, previo estudio por parte de profesionales tanto sociales como judiciales, sin embargo, a día de hoy, esto está lejos de ocurrir pues con las vacunas actuales los anticuerpos producidos sólo persisten en el cuerpo unas pocas semanas, de manera que sólo podrían ser efectivas en pacientes comprometidos con su tratamiento. Además, en caso de obtener una vacuna efectiva en la prevención de la adicción, existen problemas judiciales a la hora de localizar a los grupos de riesgo, pues podrían estar sometidos a discriminación, ocasionando un problema ético aún sin resolver para planificar una estrategia de vacunación.

Los avances conseguidos hasta ahora son fundamentales en la búsqueda de una vacuna eficiente y segura. Sin embargo, es necesario continuar investigando e invirtiendo en este camino. Su desarrollo en un futuro podría ser clave no solo para el abuso de la cocaína en este caso, sino el principio de un nuevo tipo de tratamiento ante diferentes drogas de abuso.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todos los profesores de la asignatura de Estrategias para la Generación de Nuevos Fármacos el habernos proporcionado los conocimientos necesarios para poder realizar este trabajo.

REFERENCIAS

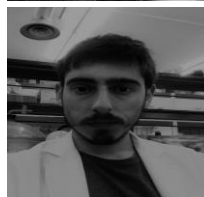
- [1] Orson, F., Kinsey, B., Singh, R., Wu, Y., & Kosten, T. (2009). Vaccines for cocaine abuse. *Human Vaccines*, 5(4), 194-199. <https://doi.org/10.4161/hv.5.4.7457>
- [2] Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones. Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España, EDADES 2019/20. Madrid: Ministerio de Sanidad. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas; 2021. 93p.
- [3] Kosten, T., Domingo, C., Orson, F., & Kinsey, B. (2014). Vaccines against stimulants: cocaine and MA. *British Journal Of Clinical Pharmacology*, 77(2), 368-374. <https://doi.org/10.1111/bcp.12115>
- [4] Spector, S., & Parker, C. (1970). Morphine: Radioimmunoassay.

Science, 168(3937), 1347-1348. <https://doi.org/10.1126/science.168.3937.1347>

- [5] Ozgen, M., & Blume, S. (2019). The continuing search for an addiction vaccine. *Vaccine*, 37(36), 5485-5490. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.074>
- [6] Carrera, M., Ashley, J., Parsons, L., Wirsching, P., Koob, G., & Janda, K. (1995). Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization. *Nature*, 378(6558), 727-730. <https://doi.org/10.1038/378727a0>
- [7] Kampman, K. (2019). The treatment of cocaine use disorder. *Science Advances*, 5(10), eaax1532. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1532>
- [8] Web de la Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/>
- [9] Schmidt, D. H., Kaufman, B. M., & Butler, V. P., Jr (1974). Persistence of hapten-antibody complexes in the circulation of immunized animals after a single intravenous injection of hapten. *The Journal of experimental medicine*, 139(2), 278-294. <https://doi.org/10.1084/jem.139.2.278>
- [10] Orson, F. M., Wang, R., Brimijoin, S., Kinsey, B. M., Singh, R. A., Ramakrishnan, M., Wang, H. Y., & Kosten, T. R. (2014). The future potential for cocaine vaccines. *Expert opinion on biological therapy*, 14(9), 1271-1283. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.920319>
- [11] Kimishima, A., Olson, M. E., & Janda, K. D. (2018). Investigations into the efficacy of multi-component cocaine vaccines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 28(16), 2779-2783. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.12.043>
- [12] Kosten, T. R., Domingo, C. B., Shorter, D., Orson, F., Green, C., Somoza, E., Sekerka, R., Levin, F. R., Mariani, J. J., Stitzer, M., Tompkins, D. A., Rotrosen, J., Thakkar, V., Smoak, B., & Kampman, K. (2014). Vaccine for cocaine dependence: a randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial. *Drug and alcohol dependence*, 140, 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.04.003>
- [13] Havlicek, D., Rosenberg, J., De, B., Hicks, M., Sondhi, D., Kaminsky, S., & Crystal, R. (2020). Cocaine vaccine dAd5GNE protects against moderate daily and high-dose "binge" cocaine use. *PLOS ONE*, 15(11), e0239780. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239780>
- [14] Web de Good Clinical Practice Network. <https://ichgcp.net/es/clinical-trials-registry/NCT02455479>



Laura Arbeloa Gómez nació el 28 de abril de 1997 en Lorca (Murcia). Formó parte de la primera promoción del grado de Biotecnología en la Universidad de Almería. Actualmente, estudia el Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.



Jaime Álvarez Vidal nació en Sevilla el 20 de febrero de 1993. Estudió el grado de Biología en la Universidad de Sevilla. Actualmente, estudia el Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.

Gas mostaza: la otra cara del enemigo

José Antonio Herrera Gavilán

Resumen— El gas mostaza fue usado como arma química durante la Primera Guerra Mundial. Sin embargo, una exposición casual a este compuesto supuso el origen de una nueva era en la lucha contra el cáncer. Así nació la quimioterapia.

Palabras Claves— Gas Mostaza, Fritz Haber, Quimioterapia, Agente Alquilante, Cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

El gas mostaza fue considerado una de las armas más destructivas durante la Primera Guerra Mundial. En su forma pura y a temperatura ambiente se encuentra en estado líquido siendo incoloro. Sin embargo, en aquella época contenía gran cantidad de impurezas, y por ello, en forma gaseosa, presentaba un color mostaza y un olor similar al ajo o al rábano picante [1], [2].

El gas mostaza es una sustancia altamente vesicante, es decir, capaz de producir grandes quemaduras y ampollas, siendo sus efectos devastadores. Al ser inhalado, el gas mostaza irrita la mucosa de la tráquea y afecta especialmente a bronquios, pulmones y ojos. Sin embargo, un descubrimiento accidental supuso el origen de un tratamiento radicalmente nuevo contra una de nuestras peores pesadillas: el cáncer. De esta manera, el gas mostaza pasó del campo de batalla de las trincheras durante la Primera Guerra Mundial a usarse en la primera línea en la lucha contra el cáncer [1], [2], [3].

2. HISTORIA

Hace cien años comenzó un gran conflicto que cambiaría el mundo para siempre. La Primera Guerra Mundial, dejaría a 17 millones de personas fallecidas o desaparecidas en acción. Todo se agravó aún más debido al empleo de químicos industriales.

En julio de 1917, las tropas con base en Ypres, Bélgica, notificaron la presencia de una nube color mostaza alrededor de sus pies y un extraño olor a ajo en el aire. En 24 horas desarrollaron ampollas y llagas horribles. Algunos comenzaron a toser sangre [1], [2], [3], [4].



Fig 1. Gas mostaza en el campo de batalla [4].

Habían sido envenenados por gas mostaza, una de las armas químicas más mortíferas desplegadas en la batalla. Y debido a que el gas mostaza se puede absorber a través de la piel, las máscaras antigás resultaron inútiles. Incluso aquellos soldados que se encontraban completamente vestidos estaban desprotegidos [4].

A continuación, en la figura 2 se muestra la estructura química del gas mostaza.

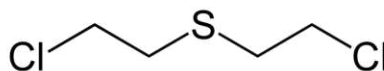


Fig 2. Estructura química del gas mostaza [5].

Como se puede observar, el gas mostaza presenta un átomo de azufre, de ahí que también reciba el nombre de mostaza sulfurada.

El gas mostaza fue uno de varios gases desarrollados por Fritz Haber, profesor de la prestigiosa Universidad de Karlsruhe. Haber fue un químico brillante que inventó un proceso para la producción a escala industrial de fertilizantes a base de amoníaco. Este brillante descubrimiento, conocido como el proceso Haber, jugó un papel muy importante para evitar las hambrunas en todo el mundo y le valió el Premio Nobel de Química en 1918. Pero el papel de Haber en el desarrollo de armas químicas significa que su legado siempre tendrá su lado oscuro. Incluso después de la guerra, Haber promovió con entusiasmo el uso de gas venenoso y sus colegas producirían otros gases mortales. De hecho, algunos conocen la Primera Guerra Mundial como la guerra de los químicos. Pero la historia del gas mostaza no acabó ahí. Y tiene un final más brillante de lo que piensas [1], [2], [3], [4].

3. PRIMERAS INVESTIGACIONES

Con la Segunda Guerra Mundial al acecho, los investigadores de la Universidad de Yale, en Estados Unidos, intentaron crear algún antídoto contra el temido gas mostaza. Dos de ellos, Alfred Gilman y Louis Goodman, analizaron los expedientes médicos de aquellos soldados que habían

estado expuestos al gas mostaza. Descubrieron una disminución significativa en el número de los glóbulos blancos [6]. Este hecho accidental llevó a la aparición de un tratamiento completamente nuevo contra uno de nuestros peores enemigos: el cáncer.

Comenzaron sus investigaciones con ratones que presentaban linfomas, un tipo de cáncer derivado de una proliferación excesiva e incontrolada de células linfoides. Tras unos resultados prometedores en animales, decidieron probar en humanos, concretamente en un paciente que también padecía un linfoma. El resultado fue espectacular y el paciente, conocido bajo las siglas J.D., mostró una reducción muy importante de las células tumorales, aunque de manera transitoria (tras un tiempo volvió a reproducirse) [6].

Los estudios realizados en la Universidad de Yale se publicaron en 1946, y se llevaron a cabo otros acerca de los mostazas nitrogenadas, hecho que dio lugar a la síntesis de los primeros agentes alquilantes como la mecloretamina, inaugurando así los fármacos derivados del gas mostaza [6].

4. FÁRMACOS DERIVADOS DEL GAS MOSTAZA

Entre los fármacos derivados del gas mostaza podemos encontrar la mecloretamina, el clorambucilo, el melfalán o la ciclofosfamida, los cuales son análogos de la mostaza nitrogenada, de ahí que presenten un átomo de nitrógeno en lugar de uno de azufre.

Todos estos fármacos son denominados agentes alquilantes y son los más utilizados en quimioterapia anti-neoplásica, al dañar el ADN e interferir en la replicación celular. Estos fármacos ejercen su acción durante todo el ciclo celular, pero son más activos sobre las células en rápida división [7].

4.1. Mecloretamina

La mecloretamina, también denominada clormetina, es un fármaco que se administra por vía tópica e intravenosa. Cuando se combina en una formulación tópica también se puede usar para tratar enfermedades de la piel.

Forma parte de la quimioterapia de combinación MOPP, junto con la vincristina, la procarbazona y la prednisona, constituyendo la primera combinación para tratar el linfoma de Hodgkin [8], [9], [10].

A continuación, se muestra su estructura química.

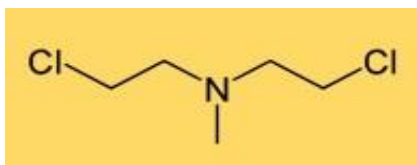


Fig 3. Estructura química de la mecloretamina. Modificado de [5].

4.2. Melfalán

El melfalán es un fármaco administrado por vía intravenosa. Es usado en el tratamiento de diferentes tumores malignos como el melanoma (cáncer de piel), sarcomas de tejidos blandos de extremidades, mieloma múltiple (un tipo de cáncer de la médula ósea), cáncer de ovario y neuroblastoma (cáncer del tejido nervioso) [8], [9], [10].

En la siguiente imagen, se muestra su estructura química.

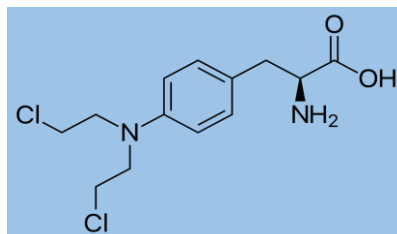


Fig 4. Estructura química del melfalán. Modificado de [5].

4.3. Clorambucilo

Por su parte, el clorambucilo es un fármaco que se administra por vía oral. Es usado en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin [8], [9], [10].

A continuación, se presenta su estructura química.

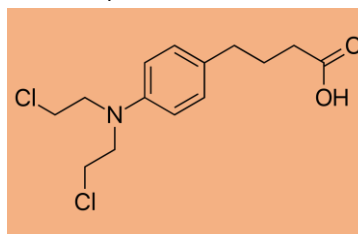


Fig 5. Estructura química del clorambucilo. Modificado de [5].

4.4. Ciclofosfamida

La ciclofosfamida es un fármaco administrado por vía oral e intravenosa. Es usado en monoterapia o combinado junto a otros agentes de quimioterapia para tratar varias clases de linfoma, como el mieloma múltiple o la leucemia. También se usa como tratamiento de tumores sólidos, como el cáncer de ovario o el mama. También es usado en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide [8],[9], [10].

En la imagen, se muestra su estructura química.

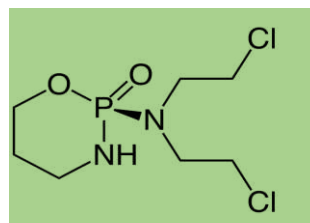


Fig 6. Estructura química de la ciclofosfamida. Modificado de [5].

5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGENTES ALQUILANTES

Todos los agentes alquilantes provocan su acción citotóxica debido a la capacidad que tienen para formar enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y numerosas moléculas de carácter nucleófilo que se encuentran en las células, en especial las bases nitrogenadas del ADN. De este modo, van a ser capaces de bloquear la replicación y la transcripción del ADN celular y por consiguiente, impiden que se lleve a cabo la mitosis y la síntesis de proteínas, desencadenando la muerte celular. Un aspecto de gran relevancia es que estos agentes actúan con mayor especificidad en el nitrógeno 7 de la guanina [7].

A continuación, se muestra un esquema en el que se ilustra el proceso descrito.

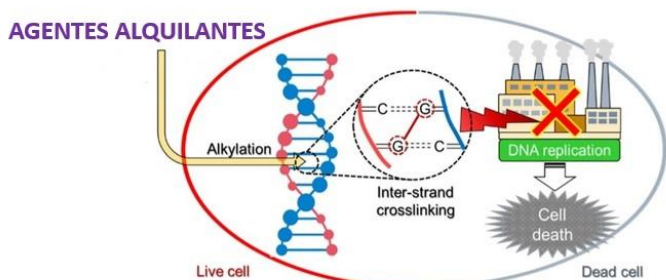


Fig 7. Proceso de alquilación del ADN. Modificado de [11].

6. EFECTOS ADVERSOS

Los agentes alquilantes tienen en común la toxicidad ocasionada en la médula ósea en forma de mielosupresión e inmunosupresión (disminución de la actividad de la médula ósea), así como en las células de las mucosas donde produce ulceración. También producen efectos negativos en el sistema nervioso central, los cuales se manifiestan con náuseas y vómitos, especialmente tras la administración de las mostaza nitrogenada por vía intravenosa.

Este grupo de fármacos son altamente leucemógenos, es decir, son capaces de producir leucemia asociada generalmente con deleciones de tipo parcial o total de los cromosomas cinco o siete. La incidencia llega al máximo alrededor de cuatro años después del tratamiento y puede afectar hasta en el 5% de los pacientes [12].

7. CONCLUSIONES

El gas mostaza es un claro ejemplo de cabeza de serie o prototipo, es decir, sirvió como base para intentar obtener derivados útiles en farmacología con actividad mejorada mediante la modificación de su estructura química. Lo que surgió como un claro enemigo en la Primera Guerra Mundial, acabó siendo uno de los grandes avances de la medicina.

Y así nació la quimioterapia, un tratamiento a base de un fármaco derivado de un compuesto químico diseñado para matar, que hoy en día salva muchas vidas. Pero la quimioterapia no es la única forma con la que se puede tratar el cáncer en la actualidad. Y cualquiera que haya pasado por esta situación sabe que, a pesar de décadas de evolución alejándose de las trincheras, sigue

siendo, para muchos, una experiencia muy difícil y desagradable. De esta manera se han desarrollado, y seguirán desarrollándose, tratamientos cada vez más dirigidos a objetivos específicos del cáncer, así como inmunoterapias, diseñadas para activar nuestras propias defensas. Pero por ahora, todavía hay un lugar para la quimioterapia, una de las primeras armas químicas en nuestro creciente arsenal contra el cáncer.

REFERENCIAS

- [1] C.M. Pechura, D.P. Rall, "Veterans at Risk: The Health Effects of Mustard Gas and Lewisite", Institute of Medicine (US), 1993.
- [2] Web de la Organización Panamericana de la Salud, <https://www.paho.org/>
- [3] Dacre JC, Goldman M. "Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard". *Pharmacol Rev.* Jun 1996. 48(2), pp: 289-326. PMID: 8804107.
- [4] "Cómo el aterrador gas mostaza ayudó a hallar un tratamiento para la enfermedad que nos aterriza", *BBC*, <https://www.bbc.com/mundo/noticias-47476328>. 2019.
- [5] Web de la Wikipedia Commons.
- [6] A. Gilman, F. S. Philips. "The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides". *Science* 103 (2675), pp. 409-436, Apr. 1946. doi:10.1126/science.103.2675.409.
- [7] R. Ranju, K. Jatinder, "Alkylating agents and cancer therapy", *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(9), pp: 1061-1075, Oct 2007. doi: 10.1517/13543776.17.9.1061
- [8] Web de OncoLink. <https://es.oncolink.org/>
- [9] Web del Hospital de Investigación St. Jude. <https://www.stjude.org/>
- [10] Web del Instituto Oncohealth. <http://www.oncohealth.eu/>
- [11] D. Han, R. Serra, N. Gorelick et al. "Multi-layered core-sheath fiber membranes for controlled drug release in the local treatment of brain tumor", *Scientific Reports*. 9, 17936 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54283-y>
- [12] L. Laurence, L. Parker; J. Lazo. (2005). "Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics" (11th ed.). New York: McGraw-Hill *Medical Publishing Division*. pp. 1322-1332.



José Antonio Herrera Gavilán es estudiante del tercer curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

Organoides: potenciales herramientas biomédicas en miniatura

Olimpia López Faba

Resumen—Los clásicos modelos de investigación *in vitro* junto con el uso animales de experimentación, se están viendo recientemente sustituidos por una novedosa herramienta capaz de recrear los complejos microambientes que engloban a tejidos y órganos humanos. Se trata de organoides, órganos en miniatura en 3D que, aun lejos de ser perfeccionados, ofrecen grandes oportunidades a la investigación biomédica y farmacológica: una mejor comprensión de mecanismos fisiológicos implicados en enfermedades humanas y un más preciso diseño de fármacos, tratamientos y terapias.

Palabras Clave— Organoides, Biomedicina, Enfermedades, Fármacos, Cultivos 3D.

1. INTRODUCCIÓN

Resulta cada vez más evidente el creciente desarrollo de nuevas y potentes herramientas biomédicas, posible gracias a un sostenido esfuerzo en inversión científica y a una estrecha colaboración entre hospitales y empresas, industrias y universidades. Los artículos publicados diariamente sobre avances en Inmunología (más de 21.000 publicaciones en PubMed en 5 meses) o Medicina Regenerativa, ponen de manifiesto este destacado crecimiento.

Sin embargo, no todo son buenas noticias en este escenario. El entendimiento de la expresión génica y los mecanismos implicados en enfermedades emergentes [1] y tumorigénesis, así como la búsqueda de fármacos contra dianas moleculares continúan siendo un reto para científicos de todo el mundo.

El estudio de enfermedades humanas *in vitro* implica la formación de cultivos celulares en 2D o 3D a partir de células y tejidos humanos aislados. Para ello, es necesario un refinado control de factores tan complejos como el microambiente, la distribución espaciotemporal del oxígeno y los nutrientes, o las interacciones célula-célula, célula-medio y célula-matriz [2]. Por su lado, el uso de modelos animales presenta limitaciones de accesibilidad para la imagen y el control de variables, además de una clara diferencia con la biología humana [3].

Afortunadamente, investigadores de disciplinas como Bioingeniería, Bioquímica o Ingeniería mecánica están trabajando en el desarrollo y mejora de una nueva herramienta capaz de reproducir fielmente aspectos fisiológicos y fisiopatológicos de órganos humanos, con vistas a producir modelos personalizados capaces de preservar las características de cada individuo. ¿De qué se trata?

2. UNA BREVE PRESENTACIÓN

2.1. Organoides. ¿Qué son?

De la palabra "órgano" y el sufijo "-oide", que significa "con forma de" o "semejante", los organoides son estruc-

turas multicelulares tridimensionales sintetizadas *in vitro* y capaces de recrear la estructura y las funciones de tejidos *in vivo*.

Procedentes de células aisladas de tejido maduro, células madre pluripotenciales inducidas o células madre embrionarias, se reorganizan de forma espontánea tras un proceso de diferenciación celular controlado mediante factores de crecimiento y nutrientes. Aun no siendo capaces de imitar órganos al completo, reproducen partes de éstos, representando un sistema modelo de elevada complejidad.

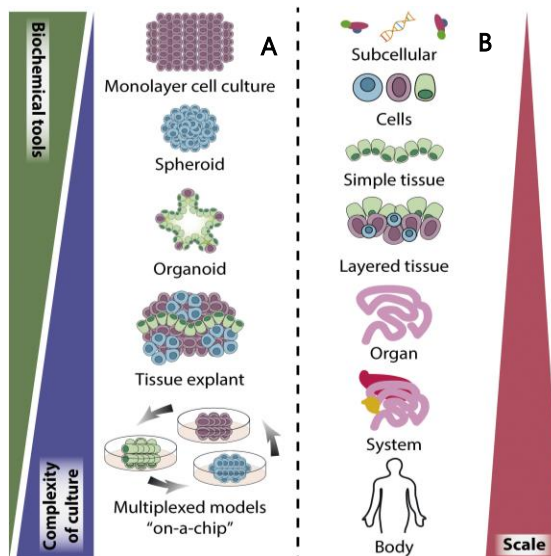


Fig 1. Jerarquía de organización de sistemas modelo en ciencias de la vida (A) frente a la disposición del cuerpo humano (B) según la escala métrica, la complejidad de los cultivos y las técnicas bioquímicas implicadas.

Adaptado de (Yin et al., 2016) [4].

2.2. ¿Cómo se forman?

En primer lugar, se lleva a cabo el aislamiento de las células que formarán el esqueleto del organoide. Para evitar que el cultivo en 3D de estas células entre en contacto

directo con la placa de plástico, se añade otro elemento indispensable, la matriz o *scaffold*. Se trata de hidrogeles biológicos o sintéticos que imitan a la matriz extracelular natural. La más usada es Matrigel, una mezcla proteica heterogénea y de aspecto gelatinoso secretada por las células Engelbreth-Holm-Swarm de sarcoma de ratón. Entre este cocktail de proteínas hay presentes proteínas adhesivas como laminina o colágeno, cuya función principal es la de servir de soporte y proporcionar las señales propias de la matriz extracelular natural a las células.

En otros casos, las células no se disponen sobre una matriz; en su lugar las células son cultivadas en pequeñas gotas de un medio de cultivo definido que pende de una placa por gravedad y tensión superficial. Otra opción para la formación de la estructura 3D es a partir de una interfase aire-líquido, donde las células se cultivan en una capa basal de fibroblastos o Matrigel inicialmente sumergidas en un medio que se evapora progresivamente [5].

Las células son posteriormente autoorganizadas siguiendo patrones espaciotemporales específicos gracias a la adición de factores de crecimiento propios del nicho de cada tipo de órgano.

3. ORGANOIDES MODELO

Estableciendo la línea temporal de acontecimientos clave en el desarrollo de organoides, se observa un exponencial progreso. Desde descubrimientos básicos a principios del siglo XX, hasta la más actual formación de organoides de

TABLA 1
AVANCES CLAVE EN EL DESARROLLO DE
ORGANOIDES

Año	Avances
1907	Autoorganización de células de esponjas
1944	Experimentos de agregación-disociación con pronefros disociados de anfibios
1960	Experimentos de agregación-disociación con órganos de embrión de pollo
1981	Establecimiento de PSCs de embriones de ratón
1998	Establecimiento de ESCs de blastocitos humanos
2006	iPSCs a partir de fibroblastos de ratón
2008	Tejido en 3D del cortex cerebral a partir de ESCs
2009	Organoides intestinales a partir de ASCs intestinales
2010	Organoides gástricos
2011	Organoides retinales a partir de SCs de ratón
2012	Organoides retinales a partir de PSCs humanas
2013	Organoides cerebrales, renales, hepáticos y pancreáticos
2014	Organoides pulmonares, prostáticos. Gastruloides
2015	Organoides de la glándula mamaria, trompas de Falopio e hipocampo
2020	Organoides de glándula secretora de veneno de serpiente

Tabla de elaboración propia. SCs (células madre), PSCs (células madre pluripotenciales), ESCs (células madre embrionarias), iPSCs (células madre pluripotenciales inducidas), ASCs (células madre adultas).

glándulas de serpiente. ¿Qué será lo siguiente?

4. APLICACIONES BIOMÉDICAS

Los organoides abren una nueva ventana en el estudio de funciones génicas básicas y procesos celulares. Además, apunta hacia el logro de prometedores avances en investigación traslacional. Entre las principales aplicaciones, destacan:

- *Modelado de enfermedades genéticas e infecciosas.* Destaca aquí el uso de organoides cerebrales para el estudio de la microcefalia producida por el virus del Zika [6], o el cocultivo de *Helicobacter pylori* con organoides gástricos para estudios epidemiológicos.
- *Toxicología.* Presentan una clara ventaja en la evaluación de la toxicidad de fármacos y la posibilidad de determinar las dosis óptimas para tratar tumores sin dañar tejidos sanos.
- *Cáncer.* A diferencia de los cultivos en 2D, los organoides mantienen la heterogeneidad de los tumores, resultando útiles para el estudio de su evolución. Es posible la recreación de varios tipos de tumores de un mismo órgano. Tal es el caso del hígado con carcinomas hepatocelulares y colangiocarcinomas.
- *Medicina de precisión y medicina regenerativa.* La combinación de organoides con tecnologías de edición génica como CRISPR/Cas9 constituyen modelos alternativos para el tratamiento de enfermedades degenerativas hereditarias monogénicas. Por otro lado, han demostrado una correcta compatibilidad al ser trasplantados en animales, como es el caso de organoides del intestino delgado murino [7].
- *Descubrimiento de nuevos fármacos.*
- *Creación de biobancos* para la conservación de y disponibilidad de muestras biológicas.

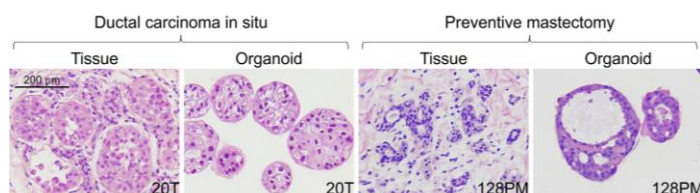


Fig 2. Representación de una comparación histológica de tejido con un carcinoma ductal *in situ* (izquierda) y una mastectomía preventiva (derecha) con sus respectivos organoides. Se observa una más definida geometría del organoide en el caso de la izquierda. Adaptado de (Sachs, 2018) [8].

5. LÍMITES Y RETOS EN LA SÍNTESIS DE ORGANOIDES

El desarrollo de estas pequeñas máquinas cuenta con obstáculos moleculares y tecnológicos aún por superar. La falta de tipos celulares complementarios necesarios para el correcto crecimiento celular dificultan el desarrollo de los organoides, especialmente en aquellos derivados de células madre adultas. Es necesario un enriquecimiento del microambiente nicho con poblaciones de células mesenquimales y del sistema inmunitario para superar esta

cuestión y comprender mejor los mecanismos subyacentes a algunas enfermedades. Variables físicoquímicas como el pH o la concentración de oxígeno también deben ser finamente reguladas.

La aplicación de un adecuado sistema de vascularización [8] con moléculas angiogénicas (formadoras de vasos sanguíneos) para un aporte suficiente de nutrientes y oxígeno supone otro gran reto. Algunas estrategias actuales para abordar esta carencia implican la neoangiogénesis, consistente en la inyección de células endoteliales dentro del sistema para promover la formación de la vasculatura, o la creación de microestructuras en 3D con propiedades mecánicas, geométricas y biológicas ajustables. Se está logrando la adición de estas células vasculares a partir de métodos de bioimpresión [9] y microfluidos.

Por otro lado, la heterogeneidad entre los individuos y la diversidad de protocolos no estandarizados dificulta el establecimiento de controles de calidad y, por consiguiente, el escalado de los organoides al nivel de órgano completo.

La ausencia de ejes anterior-posterior o ventral-dorsal guías de la direccionalidad de los organoides se presenta como otro límite, principalmente para organoides cerebrales [10]. Algunas soluciones alternativas incluyen el uso de fibras biocompatibles como PLGA o la producción por separado *in vitro* de cada región del cerebro y su implantación en el organoide en el mismo orden.

6. CONCLUSIONES

La sorprendente evolución en el desarrollo de organoides pone de manifiesto el alcance de esta tecnología en investigación clínica y traslacional. Supone una revolución sin precedentes para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas nunca antes abordadas. La facilidad que ofrecen para la manipulación del comportamiento celular y el control genético, junto con todas las aplicaciones revisadas, hacen de esta herramienta la candidata perfecta para el comienzo de una biomedicina transformadora.

Aun pendiente de mejora en algunos aspectos, una más profunda investigación en la combinación de organoides y bioingeniería traerá consigo el desarrollo de modelos y plataformas de nueva generación para estudios fisiológicos mucho más complejos.

Como en cada paso dado en Ciencia, algunas cuestiones relevantes quedan a la espera de ser respondidas.

¿Supondrán los organoides el fin de la experimentación animal? ¿Lograrán la simulación de humanos al completo?

Todo parece apuntar a un mayúsculo "sí".

7. REFERENCIAS

[1] Fisher, M. C., & Murray, K. A. (n.d.). Emerging infections and the integrative environment-health sciences: the road ahead. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00510-1>

[2] Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J. & Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology (Bethesda)* 32(4), 266–277.

[3] Wimmer, A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Wick, N., Hantusch, B., Novatchkova, M., Taubenschmid, J., Hämmerle, M., Esk, C., Bagley, J. A., Lindenhofer, D., Chen, G., Boehm, M., Agu, C. A., Yang, F., Fu, B., Zuber, J., Knoblich, J. A., Kerjaschki, D., & Penninger, J. M. (2019).

[4] Yin, X., Mead, B. E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J. M., & Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. In *Cell Stem Cell* (Vol. 18, Issue 1, pp. 25–38). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>

[5] Kalabis J, Wong GS, Vega ME, Natsuzaka M, Robertson ES, Herlyn M, Nakagawa H, Rustgi AK. Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture. *Nat Protoc* 7: 235–246, 2012. doi:10.1038/nprot.2011.437

[6] Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* 352: 816–818, 2016. doi:10.1126/science.aaf6116.

[7] Fordham, R.P., Yui, S., Hannan, N.R., Soendergaard, C., Madgwick, A., Schweiger, P.J., Nielsen, O.H., Vallier, L., Pedersen, R.A., Nakamura, T., et al. (2013). Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell* 13, 734–744

[8] N. Sachs *et al.*, "A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity," *Cell*, vol. 172, no. 1–2, pp. 373–386.e10, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2017.11.010

[9] Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature*.

[10] Y. S. Zhang, Q. Pi, and A. M. Van Genderen, "Microfluidic Bioprinting for Engineering Vascularized Tissues and Organoids," *J. Vis. Exp.*, no. 126, p. 55957, 2017, doi: 10.3791/55957.

[11] I. Kelava and M. A. Lancaster, "Stem Cell Models of Human Brain Development," *Cell Stem Cell*, vol. 18, no. 6. Cell Press, pp. 736–748, Jun. 02, 2016, doi: 10.1016/j.stem.2016.05.022.



Olimpia López Faba, graduada en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide.

Nanotecnología en el campo de la Ingeniería Tisular

Gloria Balboa Carmona, Sara Estévez Sánchez

Resumen— La Ingeniería de Tejidos es un campo científico en auge que se basa en la combinación de conocimientos biológicos y de ingeniería con fines terapéuticos. Para su desarrollo, se emplean sustitutos celulares, matrices o andamios y sustancias inductoras. Los avances en nanotecnología se han incorporado a la ingeniería tisular para mejorar en concreto los andamios tisulares con el empleo de nanomateriales. A continuación, se muestra una breve descripción de aplicaciones concretas de nanomateriales en el campo de la Ingeniería Tisular dental, ósea, cutánea y en la liberación de fármacos. Una correcta aplicación de la nanociencia en los campos descritos conllevará grandes avances en la Medicina Regenerativa y Preventiva.

Palabras Claves—: Andamio, Biocompatibilidad, Ingeniería Tisular, Nanopartículas de hidroxiapatita y Quitosano.

1. INTRODUCCIÓN

La Ingeniería Tisular es una disciplina que utiliza la combinación de los conocimientos de la biología y la ingeniería con fines terapéuticos. Se plantea como una solución diferente a los trasplantes tradicionales que pretenden restaurar la funcionalidad de un órgano o tejido en el paciente. En este campo se desarrollan sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos. Para la creación de estos se abordan tres estrategias: sustitutos celulares, sustancias inductoras o la combinación de células y matrices [1]. En el caso de la última estrategia, las matrices o scaffolds que se utilizan han de cumplir ciertas características para poder promover la regeneración tisular (biocompatibilidad, adhesión, migración, proliferación y biodegradabilidad). También son de vital importancia las propiedades mecánicas y la arquitectura de la matriz para formar un microambiente idóneo que se asemeje a las estructuras nativas del tejido u órgano que se quiere reemplazar [2].

La nanotecnología toma un rol importante en la generación de andamios adecuados para la ingeniería tisular, generando materiales nanoestructurados que imitan componentes naturales de la matriz extracelular y pueden suministrar sustancias como los fármacos.

A continuación, se describen diferentes tipos de síntesis y funcionalización de algunos nanomateriales que se utilizan en ingeniería tisular, además de algunas aplicaciones de estos en ingeniería de tejidos dental, ósea, de piel y de administración de fármacos.

2. CARACTERÍSTICAS DE LOS NANOMATERIALES USADOS EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

2.1. Síntesis de nanomateriales

La síntesis de nanomateriales es un proceso que ha de

controlarse cuidadosamente, siendo necesario el desarrollo de métodos que controlen, fundamentalmente, el tamaño y la forma de las nanopartículas. Los métodos de síntesis actuales para la creación de nanomateriales apli-

— — — — — ◆ — — — — —
TABLA 1
MÉTODOS DE SÍNTESIS DE NANOMATERIALES

Métodos químicos	Métodos físicos	Métodos biológicos
Reducción química	Descarga de arco	Bacteria
Coprecipitación	Molino de bolas	Enzimas y biomoléculas
Electroquímica	Evaporación-condensación	Hongos
Emulsión-Difusión	Litografía	Extractos de plantas
Poliol	Descarga de alambre pul-sado	
Precipitación salina	Interfaz líquido-líquido	
Pirólisis	Pirólisis en spray	
Descomposición térmica	Fase vapor y gas	
Sonoquímica	Evaporación del solvente	

Principales métodos de síntesis de nanomateriales.

cables a la ingeniería de tejidos se resumen en la Tabla 1.

2.3. Caracterización de nanomateriales

La caracterización de los nanomateriales incluye diferentes técnicas basadas en propiedades concretas de los nanomateriales tales como la carga de su superficie, su concentración, sus propiedades térmicas, su estabilidad y biocompatibilidad. La importancia de este proceso radica en el hecho de que las funciones de los nanomateriales dependen estrechamente de las características de estos, por lo que conocer sus propiedades es indispensable para su óptima aplicación en ingeniería de tejidos.

2.4. Toxicidad de nanomateriales

En la aplicación de la nanotecnología en el campo de

la ingeniería tisular se debe tener en cuenta, con especial énfasis, la toxicidad que estos pudieran ocasionar en los tejidos donde se implanten. En primer lugar, hemos de conocer los efectos bioquímicos en los tejidos que tienen la implantación del nanomaterial y, en segundo lugar, debemos cercionarnos de que sean transformaciones beneficiosas y nunca perjudiciales o que, al menos, los efectos positivos contrarresten los negativos. Los mecanismos de nanotoxicidad *in vivo* son numerosos, pudiendo incluir, entre otros, inflamación pulmonar y sistémica, activación plaquetaria, variabilidad alterada de la frecuencia cardíaca y disfunción vasomotora [3]. Es fundamental, por lo tanto, diseñar estrategias que contemplen nanomateriales no tóxicos y aptos para el proyecto de ingeniería tisular en concreto que se pretenda desarrollar.

3. APLICACIONES DE NANOMATERIALES EN LA INGENIERIA TISULAR

3.1. Aplicaciones de nanomateriales en ingeniería tisular dental

Con la edad el tejido periodontal y la capacidad de autorreparación disminuye, necesitando pues tratamientos efectivos para reparar y restaurar la funcionalidad de los tejidos dañados. Avances en el desarrollo de nanomateriales metálicos y poliméricos han servido de apoyo al tratamiento de estas patologías [4].

La periodontitis es una alteración en la que se produce inflamación conduciendo a la pérdida de dientes en adultos y a la destrucción del periodonto. Se han aplicado composites basados en ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) para la regeneración del tejido periodontal mostrando excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad. Se utiliza una malla de PLGA a nanoescala sembrada con células madre obtenidas del ligamento periodontal, y se coloca en la herida periodontal para promover así la formación de tejido. Las células sembradas mantienen su viabilidad, morfología, fenotipo y muestran marcadores osteogénicos regulados positivamente [5].

También se han aplicado nanopartículas de quitosano, sílice y poli (ϵ -caprolactona). Por ejemplo, las nanopartículas de sílice monodispersas reducen las uniones bacterianas a superficies de poliestireno, polietileno y cloruro de polivinilo, lo que indica que la presencia de estas destruye la formación de biofilms bacterianas en los injertos. Esto permite eliminar la necesidad de agentes biocidas [6].

3.2. Aplicaciones de nanomateriales en ingeniería tisular ósea

Las nanopartículas se proponen como materiales para la ingeniería tisular ósea debido a su biocompatibilidad y bioseguridad, además de ser naturalmente degradables. Sistemas diseñados en base a la nanotecnología son capaces de imitar con bastante similitud las estructuras observadas en el hueso.

Un ejemplo de ello podría ser un implante impreso en 3D que libere simultáneamente fármacos anticancerosos y factores de crecimiento para la terapia antitumoral y la osteogénesis [7]. El implante propuesto se realizó mediante el ensamblaje de un compuesto basado en polidopamina junto con nanopartículas de hidroxiapatita en andamios de gelatina impresos en 3D. Como principal componente inorgánico del tejido óseo, las nanopartículas de hidroxiapatita han sido cada vez más populares en el estudio de ingeniería de tejido óseo. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el armazón diseñado poseía una buena osteoinductividad para inducir la diferenciación ósea y así promover la formación de hueso nuevo. Las aplicaciones biomédicas de este avance nanotecnológico son numerosas.

El quitosano es otro material popular en la ingeniería de tejidos; sin embargo, frente a la ingeniería tisular ósea presenta limitaciones con respecto a su inductividad osteogénica y robustez mecánica. Por ello, se ha propuesto su hibridación con nanopartículas de dióxido de titanio (TiO_2) para mejorar su capacidad de regeneración ósea [8]. Un posterior análisis mostró que las nanopartículas de TiO_2 se distribuían uniformemente sobre la superficie de las esponjas de quitosano y la formación de apatito en la superficie de estas. Se sugiere, por lo tanto, este nuevo andamio como posibilidad con alto potencial para la ingeniería de tejido óseo.

3.3. Aplicaciones de nanomateriales en ingeniería tisular cutánea

El proceso de curación de una herida es un proceso fisiológico especialmente delicado que incluye procesos complejos como la hemostasis, la inflamación y la regeneración del tejido. Se propone el uso de nanopartículas en la bioingeniería de la piel como estrategia para aumentar las ventajas de técnicas previamente existentes y por presentar una alta bioseguridad. Los nanomateriales propuestos para esta labor deberían ayudar en la regeneración de queratinocitos, unirse estrechamente a la dermis, remodelar los vasos sanguíneos y ofrecer un soporte estructural elástico. Un nanomaterial propuesto para dicha labor es la nanocelulosa. Se trata de un polímero lineal de glucosa capaz de ser estructurado en nanofibras, nanocristales o nanobolas, entre otras muchas conformaciones [9]. La nanocelulosa presenta una resistencia mecánica adecuada, una alta capacidad de absorción de agua que permite mantener la humedad en la piel dañada y, al mismo tiempo, permite absorber el exudado de la herida. La morfología a nanoescala de la nanocelulosa imita la arquitectura de la matriz extracelular nativa y, por lo tanto, puede funcionar como un sustrato para la adhesión y el crecimiento de las células propias de la piel. Además, algunos tipos de nanocelulosa, como la derivada de la madera, presenta propiedades antimicrobianas.

3.4. Aplicaciones de nanomateriales en liberación de fármacos

En este caso, la relación entre la liberación de fármacos y la ingeniería tisular se centra en desarrollar biomateriales nanoestructurados para formar sistemas que transporten y liberen fármacos de forma controlada, sin efectos nocivos en el resto del cuerpo. Un ejemplo de un aspecto que se podría mejorar con este sistema es la tasa de supervivencia celular, que en los primeros días tras el trasplante del constructo es baja. Nanomateriales disponibles que permiten la administración de fármacos son dendrímeros, nanoesferas poliméricas, liposomas, nanopartículas lipídicas, micelas y nanomateriales inorgánicos (como óxido de hierro, oro y silicio).

Los nanosistemas de micelas son un ejemplo que ha demostrado ser eficaz en la administración de fármacos. En estudios previos se demostró la eficacia de micelas sensibles a pH/redox en la coadministración de NLG919 y CUR para inmunoterapia IDO mejorada con quimioterapia. Superando las barreras biológicas e impulsando significativamente la respuesta inmune antitumoral [10].

5. CONCLUSIONES

El avance y desarrollo de los nanomateriales ofrece una gran oportunidad para la ingeniería de tejidos, solventando algunos problemas encontrados y mejorando las técnicas empleadas hasta el momento. Entre otros, se resuelve la ausencia de biocompatibilidad en matrices diseñadas con materiales no orgánicos. Sin embargo, aunque los nanomateriales aporten beneficios importantes, es necesario tener en cuenta también los riesgos que conlleva su uso, como la nanotoxicidad, y que, en ocasiones, los procesos que han de desarrollarse para su adaptación en matrices son complejos y requieren un aporte económico importante. A pesar de todo ello, las recientes aplicaciones de la nanotecnología en la ingeniería tisular ósea, dental, cutánea o de distribución de fármacos, entre otras, representan un avance cuantitativo para la Medicina Regenerativa. El futuro que se vislumbra para esta combinación de ámbitos científicos es complejo y prometedor a partes iguales.

REFERENCIAS

- [1] R. Langer y J. P. Vacanti, «Tissue engineering», *Science*, vol. 260, n.º 5110, pp. 920-926, may 1993, doi: 10.1126/science.8493529.
- [2] F. J. O'Brien, «Biomaterials & scaffolds for tissue engineering», *Mater. Today*, vol. 14, n.º 3, pp. 88-95, mar. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [3] Y.-W. Huang, M. Cambre, y H.-J. Lee, «The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, n.º 12, dic. 2017, doi: 10.3390/ijms18122702.
- [4] A. Besinis, T. De Peralta, C. J. Tredwin, y R. D. Handy, «Review of nanomaterials in dentistry: interactions with the oral micro-

environment, clinical applications, hazards, and benefits», *ACS Nano*, vol. 9, n.º 3, pp. 2255-2289, mar. 2015, doi: 10.1021/nn505015e.

- [5] X. Sun, C. Xu, G. Wu, Q. Ye, y C. Wang, «Poly(Lactic-co-Glycolic Acid): Applications and Future Prospects for Periodontal Tissue Regeneration», *Polymers*, vol. 9, n.º 6, jun. 2017, doi: 10.3390/polym9060189.
- [6] Y. Boguslavsky *et al.*, «Eliminating the Need for Biocidal Agents in Anti-Biofouling Polymers by Applying Grafted Nanosilica Instead», *ACS Omega*, vol. 3, n.º 10, pp. 12437-12445, oct. 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b01438.
- [7] Y. Jiang *et al.*, «Bioinspired adhesive and tumor microenvironment responsive nanoMOFs assembled 3D-printed scaffold for anti-tumor therapy and bone regeneration», *Nano Today*, vol. 39, p. 101182, ago. 2021, doi: 10.1016/j.nantod.2021.101182.
- [8] R. Ikono *et al.*, «Enhanced bone regeneration capability of chitosan sponge coated with TiO₂ nanoparticles», *Biotechnol. Rep.*, vol. 24, p. e00350, dic. 2019, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00350.
- [9] L. Bacakova *et al.*, «Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing», *Nanomaterials*, vol. 9, n.º 2, ene. 2019, doi: 10.3390/nano9020164.
- [10] L. Dai *et al.*, «Programmable prodrug micelle with size-shrinkage and charge-reversal for chemotherapy-improved IDO immunotherapy», *Biomaterials*, vol. 241, p. 119901, may 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.119901.



Gloria Balboa Carmona recibió el título de Graduada en Bioquímica por la Universidad de Sevilla en 2020. Actualmente, es estudiante del Máster Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla. Su interés investigador reside en la Biología del Desarrollo y sus aplicaciones en la Medicina Personalizada.



Sara Estévez Sánchez recibió el título de Bióloga por la Universidad de Málaga en 2019, y realizó el máster de Ingeniería Tisular y Terapias Avanzadas en la Universidad de Granada en 2020. Actualmente es estudiante de la Universidad Pablo de Olavide, en el máster de Biotecnología Sanitaria. Su interés investigador reside en el estudio del envejecimiento y la medicina regenerativa

Síntesis de nanopartículas de oro empleando bacteriófagos para la destrucción del biofilm

Irene Herrero-Gómez y Gonzalo Sánchez-Domínguez

Resumen— El aumento de la incidencia en la resistencia a antibióticos por parte de ciertas bacterias patógenas está provocando persistencia en las infecciones e incrementando el riesgo de enfermedad y transmisión. Como alternativa terapéutica a los antibióticos, se están estudiando los bacteriófagos, pero su efectividad se ve limitada dado que la mayoría no pueden atravesar el biofilm, estructura formada por aglomeraciones de bacterias que se encuentran adheridas a superficies y que están rodeadas por una matriz excretada por las mismas. En ese sentido, la nanomedicina puede ser una estrategia para la destrucción del biofilm de bacterias resistentes. Las nanopartículas de oro formadas en la reacción entre cloruro de oro y bacteriófagos han demostrado poseer actividad antimicrobiana y antibiofilm.

Palabras Claves— Antimicrobiano, Bacteriófago, Biofilm, Nanopartículas de oro, Resistencia a antibióticos.



1. INTRODUCCIÓN

Se estima que en 2050 habrá 10 millones de muertes causadas por la problemática de la resistencia a antibióticos [1]. Dicha característica se define como la capacidad de las bacterias para resistir los efectos terapéuticos de los fármacos antibacterianos, dando como resultado la persistencia de infecciones, provocando un aumento del riesgo de enfermedad y transmisión [2]. Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) [3] ha elaborado una lista de bacterias patógenas para la búsqueda de nuevos antimicrobianos, donde se establecen tres rangos de prioridad: crítica, elevada y media. En el grado de prioridad crítico, se incluyen bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos: *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro del grupo de prioridad elevada, se encuentran *Staphylococcus aureus*, resistente a metilicina y con sensibilidad intermedia y resistente a vancomicina; *Enterococcus faecium*, con resistencia a vancomicina; *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina; *Salmonellae* y *Campylobacter spp.*, con resistencia a fluoroquinolona y *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporina y fluoroquinolona. Bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp.* están incluidos en el rango de prioridad media, siendo resistentes a penicilina, ampicilina y fluoroquinolona, respectivamente.

El aumento de bacterias resistentes ha favorecido el estudio de los bacteriófagos como alternativa terapéutica. Los bacteriófagos, también denominados ‘fagos’, son virus que solo infectan bacterias. Estos son muy específicos, atacando únicamente a un hospedador determinado, ya sea una especie o incluso una cepa bacteriana concreta.

Dicha característica supone una gran ventaja frente a los antibióticos convencionales, ya que presenta menos interacciones con la microbiota en comparación con antibióticos, los cuales alteran frecuentemente la microbiota gastrointestinal, provocando infecciones secundarias oportunistas. De hecho, existen estudios que han demostrado la eficacia de esta terapia en infecciones cutáneas e intestinales humanas [4]. No obstante, esta terapia presenta una limitación frente a cierto grupo de bacterias, ya que la mayoría de los fagos no pueden penetrar el biofilm, una matriz formada por ciertas bacterias y compuestos que proporciona protección frente a ambientes hostiles, y además supone una ventaja en cuanto a su patogénesis, siendo difíciles de eliminar con terapias convencionales [5].

Estas limitaciones han suscitado un especial interés por encontrar una solución a este problema. Por ello, los estudios actuales se dirigen al descubrimiento de nuevas técnicas para superar estos obstáculos. Por ejemplo, existen bacteriófagos que codifican enzimas polimerasas, pero con una efectividad media [6]. En este sentido, la nanomedicina desempeña un papel fundamental en el aumento de la eficacia de la terapéutica existente, al mejorar las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad de los bacteriófagos, además de destruir parte del biofilm.

2. PAPEL DEL BIOFILM EN LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

El biofilm es una estructura formada por aglomeraciones de células que se encuentran adheridas a superficies bióticas o abióticas. Estas células permanecen rodeadas por una matriz excretada por las mismas.

La formación de biofilm es un proceso que consta de varias etapas: adhesión microbiana, producción y acumulación de matriz extracelular. Dicha matriz está compuesta por una o más sustancias poliméricas como proteínas, polisacáridos, sustancias húmicas, ADN extracelular y a veces otras moléculas como las que intervienen en la comunicación entre células. Por tanto, el biofilm permite la comunicación entre células, la transferencia horizontal de genes y la formación de consorcios sinérgicos. Además, la matriz protege a los microorganismos de la desecación, biocidas, antibióticos, metales pesados, radiación ultravioleta y defensas inmunes del huésped. La gran variedad de componentes de la matriz provoca que su degradación requiera una amplia gama de enzimas [7].

Actualmente se sabe que la mayoría de los microorganismos que se encuentran en la naturaleza están adheridos a superficies dentro del ecosistema que proporciona el biofilm, y no como organismos que flotan libremente [8]. Se ha descrito que las bacterias que están en biofilms exhiben una mayor tolerancia a los antibióticos, siendo difíciles de eliminar al emplear los tratamientos convencionales [9].

3. INTERACCIÓN BACTERIÓFAGO – BIOFILM

Los bacteriófagos presentan un tamaño variable, pero dentro de la escala nanométrica (20-200 nm). En cuanto a su estructura, están compuestos por ADN o ARN, rodeados por una envoltura proteica formando la cápside. A esta se encuentra unida una estructura tubular proteica denominada cola, y en el extremo inferior se encuentra la placa base, que se encarga del contacto con las bacterias (Figura 1). Además, los fagos pueden presentar estructuras accesorias que aportan especificidad en la infección [10].

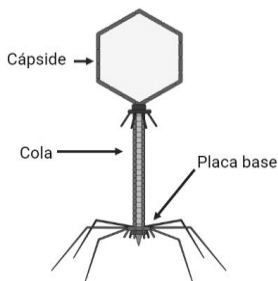


Fig. 1. Estructura básica del bacteriófago.

Como se ha mencionado previamente, los bacteriófagos suponen una alternativa a las terapias convencionales. Esto es debido a una serie de ventajas que estos ofrecen, como su alta especificidad, su actividad frente a bacterias

resistentes a antibióticos y la autorreplicación, consecuencia de su ciclo lítico [10].

En cuanto a la interacción entre el biofilm que presentan algunas bacterias y los fagos, se ha observado que este puede formar sumideros de bacteriófagos. Dado que los fagos se adsorben de forma irreversible a dicha estructura, quedan secuestrados y, por tanto, se reducen las infecciones de los bacteriófagos en las bacterias. [11]. No obstante, existen bacteriófagos que presentan actividad depolimerasa, consiguiendo degradar el biofilm, por lo que son capaces de liberarse y seguir infectando a las bacterias, aunque no presentan un porcentaje alto de degradación [12]. Por ejemplo, el fago PT-6 de *P. aeruginosa* con actividad de degradación de alginato es capaz de reducir la viscosidad de polímeros de alginato entre un 62 y un 66 % [13].

4. USO DE NANOPARTÍCULAS PARA LA DESTRUCCIÓN DE BIOFILM DE BACTERIAS RESISTENTES

Recientemente, se ha valorado la síntesis de nanopartículas mediadas por virus, concretamente por bacteriófagos. Se ha descrito la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) mediante el uso de fagos como agente reductor. Estas AuNPs presentaron potencial actividad antibacteriana y antibiofilm contra la bacteria resistente a antibióticos carbapenémicos *P. aeruginosa*.

Ahiwale *et al.* [14] inocularon un cultivo de *Salmonella* serovar Paratyphi B con un cultivo de fagos capaces de lisar ese serovar. Añadieron tampón SM con un pH de 7,5, empleado en suspensiones de fagos, a las placas de *Salmonella* que contenían calvas de lisis con la finalidad de que los fagos se diluyesen en este. Las calvas de lisis se definen como áreas donde se ha producido infección de bacterias por la acción de los fagos. El tampón con los fagos se centrifugó y se filtró, obteniéndose de este modo el lisado de fagos. La reacción de síntesis de AuNPs contenía cloruro de oro y lisado de fagos. La disolución de cloruro de oro se formó añadiendo sal de cloruro de oro en agua destilada. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente, hasta observar un cambio de color en el medio. Con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana de las nanopartículas de oro, usaron la técnica de difusión en agar. Se añadieron diferentes alícuotas de las nanopartículas a los pocillos preparados en placas de agar nutritivo estériles sembradas con cultivo bacteriano. Las placas se mantuvieron en refrigeración para permitir la difusión de las nanopartículas en el medio. Acto seguido, se incu-

baron a 37°C durante 24h y se observó la zona de inhibición del crecimiento debido a las nanopartículas sintetizadas por fagos.

También se determinó la actividad anti-biofilm de las AuNPs en la superficie de un cristal. Para ello, se adicionaron distintas concentraciones de AuNPs al cultivo de *P. aeruginosa* en caldo nutritivo en placa de Petri. Posteriormente sumergieron portaobjetos de vidrio en el cultivo bacteriano y se incubó a 37 ° C durante 24 h. Se observó y evaluó la formación de los biofilms en portaobjetos de vidrio, en presencia y ausencia de AuNPs sintetizadas a partir de fagos mediante microscopía de fluorescencia. El biofilm se tiñó con naranja de acrilamida y se cuantificó mediante el ensayo de cristal violeta.

El fago empleado para la síntesis de AuNPs pertenecía a la familia Podoviridae, morfológicamente similar a los fagos del morfotipo C3, caracterizados por una cápside muy larga y con forma de cigarro, y una cola corta [14]. En un estudio en el que se empleó un fago parecido a este, se observó que presentaban muchas características únicas, como alto potencial de replicación, tiempo corto de replicación y estabilidad en un rango amplio de pH y temperatura, lo que lo convertía en un agente de biocontrol ventajoso frente a cepas de bacterias resistentes [15].

Las AuNPs sintetizadas a partir de fagos se probaron contra varios cultivos bacterianos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella serovar Paratyphi B*. Estas mostraron la mayor actividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella serovar Paratyphi B*. Cabe destacar que la actividad de las AuNPs contra *Pseudomonas aeruginosa* fue mayor que la de las AuNPs no sintetizadas por fagos, comparando resultados con otros estudios, ya que se observa un diámetro mayor de la zona de inhibición [16], [17]. El mecanismo de inhibición no se conoce del todo, pero se ha sugerido que las AuNPs interfieren con la síntesis de ADN, ARN y la síntesis de proteínas [17].

En cuanto a la actividad antibiofilm, se observó dicha actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. La inhibición del biofilm aumentó en comparación con el control, encontrándose un 70-80% de biofilm destruido [14].

5. CONCLUSIONES

Las nanopartículas de oro sintetizadas mediante el uso de bacteriófagos han demostrado ser muy eficaces frente a la destrucción de *Pseudomonas aeruginosa*, la cual, según la

OMS, es una bacteria resistente a antibióticos con un grado de prioridad crítico. Dicha eficacia es debida a su estabilidad a diferentes rangos de pH y temperatura, gran actividad antibacteriana y antibiofilm. Esto permite desarrollar un nuevo tratamiento que resuelva la situación que ha creado el actual incremento de bacterias resistentes a antibióticos

REFERENCIAS

- [1] J. O'Neill, "Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations," 2014.
- [2] F. Micoli, F. Bagnoli, R. Rappuoli, and D. Serruto, "The role of vaccines in combating antimicrobial resistance," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 19, no. 5. Nature Research, pp. 287–302, 01-May-2021.
- [3] "WHO publishes a list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed" *Saudi Med. J.*, vol. 38, no. 4, 2017.
- [4] E. Criscuolo, S. Spadini, J. Lamanna, M. Ferro, and R. Burioni, "Bacteriophages and Their Immunological Applications against Infectious Threats," *Journal of Immunology Research*, vol. 2017.
- [5] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, "Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 2. pp. 95–108, Feb-2004.
- [6] J. K. Patra *et al.*, "Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects 10 Technology 1007 Nanotechnology 03 Chemical Sciences 0306 Physical Chemistry (incl. Structural) 03 Chemical Sciences 0303 Macromolecular and Materials Chemistry 11 Medical and He," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1. BioMed Central Ltd., 19-Sep-2018.
- [7] H. C. Flemming and J. Wingender, "The biofilm matrix," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 623–633, 02-Sep-2010.
- [8] J. Azeredo *et al.*, "Critical review on biofilm methods," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 43, no. 3. Taylor and Francis Ltd, pp. 313–351, 04-May-2017.
- [9] P. S. Stewart and J. W. Costerton, "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms," *Lancet*, vol. 358, no. 9276. Elsevier Limited, pp. 135–138, 14-Jul-2001.
- [10] L. Fernández, D. Gutiérrez, A. Rodríguez, and P. García, *Los bacteriófagos. Los virus que combaten infecciones*, Catarata. Madrid: CSIC, 2020.
- [11] M. F. Hansen, S. Lo Svenningsen, H. L. Røder, M. Middelboe, and M. Burmølle, "Big Impact of the Tiny: Bacteriophage-Bacteria Interactions in Biofilms," *Trends in Microbiology*, vol. 27, no. 9. Elsevier Ltd, pp. 739–752, 01-Sep-2019.
- [12] D. P. Pires, H. Oliveira, L. D. R. Melo, S. Sillankorva, and J. Azeredo, "Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, no. 5. Springer Verlag, pp. 2141–2151, 01-Mar-2016.
- [13] T. Glonti, N. Chanishvili, and P. W. Taylor, "Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginate acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 108, no. 2, pp. 695–702, Feb. 2010.
- [14] S. S. Ahiwale, A. V. Bankar, S. Tagunde, and B. P. Kapadnis, "A Bacteriophage Mediated Gold Nanoparticles Synthesis and Their Anti-biofilm Activity," *Indian J. Microbiol.*, vol. 57, no. 2, pp. 188–194, Jun. 2017.
- [15] S. Ahiwale, V. Bankar, N. Tagunde, S. Zinjarde, H. Ackermann, and B. P. Kapadnis, "Isolation and characterization of a rare waterborne lytic phage of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B," *Can. J. Microbiol.*, vol. 59, no. 5, pp. 318–323, May 2013.

- [16] A. Bankar, B. Joshi, A. Ravi Kumar, and S. Zinjarde, "Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 80, no. 1, pp. 45–50, Oct. 2010.
- [17] B. Nithya and A. Jayachitra, "Improved Antibacterial and Antibiofilm Activity of Plant Mediated Gold Nanoparticles using *Garcinia cambogia*," *Int. J. Pure App. Biosci*, vol. 4, no. 2, pp. 201–210, 2016.



Irene Herrero Gómez. Graduada en Biotecnología por la Universidad de Almería en 2020. Actualmente, estudiante del Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla). Sus intereses académicos incluyen la microbiología sanitaria, ingeniería genética y búsqueda de tratamientos frente a enfermedades.



Gonzalo Sánchez Domínguez. Graduado en Bioquímica por la Universidad de Extremadura en 2020. Actualmente, estudiante del Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla). Sus intereses académicos incluyen la farmacología, la química orgánica y la inmunología.



El perfume en Pompeya

María Matesanz Benito

Resumen— El estudio de la producción y uso de perfumes en la antigua Roma, ejemplificado en la ciudad de Pompeya, ha permitido gracias a una intensa colaboración científica interdisciplinar y una visión integradora conocer parte de un pasado intangible. La ciencia ha rescatado de un tiempo lejano algo que se presumía imposible, su olor.

Palabras Claves— Arqueología, Caracterización, Perfumes, Pompeya, GC-MS.



1. INTRODUCCIÓN

Un olor, un aroma, un perfume nada hay tan poderoso ni evocador. Nos trasladan en el tiempo de un plumazo y forman parte de la historia de la humanidad desde que prácticamente existen registros, pero ¿cómo se estudian?, ¿cómo se pueden atrapar estas pistas invisibles del pasado? El estudio de los perfumes antiguos involucra muchas disciplinas científicas y aunque la arqueología de los perfumes comenzó en el siglo XIX, la investigación de la producción en los talleres es reciente ¿Cómo se fabricaban?, ¿de qué se componían?, ¿cómo se usaban? Estas preguntas han sido contestadas en los últimos años gracias en buena parte a los descubrimientos realizados en Pompeya [1] [2], la ciudad enterrada bajo toneladas de cenizas en el año 79 D.C. y perdida durante siglos, continua ofreciendo un sinfín de conocimientos. El objetivo del artículo es revisar como la colaboración entre ciencias ha logrado desentrañar parte de los procesos de fabricación de perfumes en la antigua Roma.

2. ESTUDIO DEL PERFUME

El estudio del perfume antiguo involucra varias disciplinas científicas y requiere de un enfoque coordinado, debido a que sus resultados solo cobran sentido en conjunto al compararlos y ponerlos en contexto [3] [4]. Entre las disciplinas más destacadas se pueden citar del campo de las humanidades a la *arqueología*, que gracias a excavaciones y análisis formula hipótesis sobre materias primas y procesos de fabricación y uso [5]. La *filología y epigrafía* que investiga e interpretan las fuentes y documentos antiguos como los textos de Teofrasto, Plinio y Dioscórides [6] o estudia documentos iconográficos como las pinturas murales de la casa Vetii en Pompeya o de la casa de los Ciervos [2].

Entre las ciencias destaca la *química analítica* que permite conocer los componentes atrapados en los restos e incluso reformularlos [5]. Estos estudios se realizan a través de la toma de muestras de los objetos hallados en las excavaciones arqueológicas [6]. Habitualmente se utilizan una combinación de técnicas para identificar los componentes orgánicos principales. Generando una especie de huella dactilar química con espectrometría de masas (DE-MS) y Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) o Cromatografía de Gases asociada a la espectrometría de masas (GC-MS) [7] [3] [5]. Esta última es la

técnica de referencia debido su gran sensibilidad para separar e identificar compuestos volátiles.

Así mismo, otras ciencias experimentales como la *botánica* a través de la *palinología* utilizando los restos de polen y esporas fosilizadas es capaz de determinar y estudiar las especies vegetales involucradas en estos procesos y reconstruir los paisajes de la época [4]. Para ello tras la toma de muestras se elimina la fracción mineral presente con procesos físico-químicos en el laboratorio mediante ataques con ácidos, acetólisis, cloraciones etc. A continuación con el resto orgánico final se realiza una valoración cuantitativa y una identificación taxonómica con técnicas de microscopía.

3. EL PERFUME EN LA ROMA ANTIGUA

Existen evidencias de la fabricación y uso de los perfumes en oriente dos mil años antes del nacimiento de Cristo. A través de las rutas comerciales se introdujeron en el mundo clásico, donde se creó una industria local que perduraría hasta el imperio romano [8].

Los perfumes tenían un papel muy destacado en la antigüedad con una doble función cosmética y medicinal. Existían muchos tipos y todo el mundo se perfumaba, no obstante, los diferentes grupos sociales utilizaban perfumes distintos. Los muy lujosos eran típicamente de la aristocracia y eran símbolo de ostentación y poder [8] [2]. Su utilización en Roma se populariza en siglo II A.C. [2] y llegó a abarcar todos los ámbitos de la sociedad. Era habitual su utilización en la vida cotidiana para uso personal, en termas o gimnasios como aceites de masaje tras el ejercicio o para perfumar los baños [1]. Se empleaba también para enmascarar olores en eventos públicos e iluminar las calles. Por otro lado eran parte esencial de ceremonias religiosas y ritos funerarios, depositándose como ofrendas para acompañar a los difuntos en su paso a la otra vida [5] [9].

2.1 Materias Primas

Los perfumes en el mundo antiguo son diferentes a los actuales. No poseen una base alcohólica, son texturas untuosas en forma líquida o de pomada con un soporte graso (*corpus*), a menudo un aceite vegetal, asociado a componentes aromáticos (*sucus*) de flores, resinas o especias. La grasa es el medio que captura la esencia con ayuda de un estabilizante que ancla el olor al excipiente y

permite su conservación. En la Tabla 1, se recogen algunas de las materias primas más utilizadas en la época.

**TABLA 1
MATERIAS PRIMAS***

Función	Materia prima: tipo
Bases grasas (Corpus)	Aceites vegetales :Aceite de olivas verdes(el más utilizado), aceite de almendras, aceite moringa, aceite sésamo
Excipiente	Ceras: Cera de abejas Grasa animales: lanolina
Esencias (sucos)	Resinas (estabilizantes): mirra, incienso, láudano, liquidámbar, betún de judea, resinas de coníferas
sustancias aromáticas	Flores :jasmín rosa, violeta , raíz de lirio, narciso, nardo Especies canela , cardamomo, azafrán
Otras	Conservantes : Sal , miel (antioxidante y antiséptica) Colorantes: cinabrio y henna Aglutinantes :gelatinas animales

*Adaptación de tabla realizada por C. Castel et al. [1].

Aunque se empleaban gran variedad de productos para la fabricación de una esencia (Tabla 1), las flores como el jasmín, el lirio y la rosa son quizás las más populares. En particular esta última tiene un uso relevante en el imperio romano. Plinio el Viejo (23-79 D.C.) relata que se rociaba agua con aroma a rosas en los teatros y que también se usaba para hidratar la piel [6]. El análisis químico de estos restos de materiales orgánicos es complicado, suelen ser mezclas fabricadas artesanalmente y muchas veces pretratadas antes de incorporarse al perfume [3]. Por otro lado han perdido por completo su aspecto original, degradándose al envejecer y sufrir las condiciones de enterramiento como material arqueológico [7].

4. POMPEYA

La región italiana de la Campania a orillas del Vesubio donde se sitúa la ciudad de Pompeya, era conocida en la antigüedad por el cultivo de flores y plantas, especialmente por sus rosas [2], para la fabricación de perfumes [8] [10] [2] [1]. En esta ciudad de vida refinada existía un tejido artesanal muy importante [11], cerca del foro y del *macellum* se situaba un barrio de perfumeros [10] similar al de Seplasia en Capoue [12] [2]. Desde hace casi dos décadas las excavaciones van desenterrando restos de tiendas, *tabernae*, dedicadas a esta labor agrupadas entorno a la Via degli Augustali [10] [13] y grandes mansiones como la Casa Ariadna [13] con usos combinados como lugares productivos o residenciales, donde se ha podido analizar toda la cadena productiva del perfume [2]. También, se han localizado inscripciones en el extremo de la calle que mencionaban a los perfumistas como gremio [2]. Confirmando de este modo la existencia de un verdadero camino dedicado a la producción de perfumes en la ciudad, con tiendas especializadas en las que se han recuperado prensas, restos de tanques, tinas, estructuras y numerosos fragmentos de recipientes, ungüentarios de cerámica (incluyendo varios de gran tamaño aparentemente para la preservación de los aceites. [10]), objetos de bronce tales como balanzas, medidores, morteros etc.

4.1. Tecnología y proceso productivo

Es posible que una parte de las materias primas vegetales necesarias para la producción de perfumes se cultivara en

los propios jardines de los talleres [2]. Análisis palinológicos en jardines pompeyanos como la Casa del Jardín de Hércules, han identificado la presencia de flores aromáticas útiles para la elaboración de fragancias, en particular rosas, lirios o violetas y es probable que poseyeran además una pequeña plantación de olivos [13].

Como excipiente (corpus) para los perfumes se buscaban aceites neutros y poco viscosos, fuentes clásicas citan el de primera prensada de olivas verdes frescas como el más utilizado en la zona por su calidad y resistencia a la oxidación. Es precisamente para evitar estos problemas de conservación que el aceite se elaboraba in situ en el taller y los perfumistas tenían prensas especiales de cuñas o tornillos con este fin [2] identificadas gracias a pinturas murales (Figura 1).



Fig. 1. Recreación de pinturas de Casa Vettii en Pompeya de las etapas de fabricación y comercio del perfume. Elaboración propia

Tras obtener el *corpus* los perfumistas extraían las esencias en frío (*enfleurage*) o en caliente mediante procesos de maceración de grasa en calderos, tinas o morteros con un aglutinante gelatinoso [2]. Después, se añadía un estabilizante, una resina y otras sustancias (colorante, conservantes etc.) a la mezcla. Esta se media, se pesaba y se vertía en ungüentarios, pequeños frascos de metal, vidrio o cerámica [9].

4.2. Comercialización

Dispuestos en estos frascos se ponían a la venta en las *tabernae* donde el cliente las adquiría. En esta época no existe diferencia entre el taller de producción y el punto de venta que era simplemente la parte abierta al público de la *tabernae* ungüentaria [1].

En Pompeya se han descrito tres épocas importantes relacionadas con los perfumes. La más antigua se remonta a la segunda mitad del siglo II A.C., la segunda va desde el fin del I A.C. a la época augusta y el último periodo abarcaría hasta el final del primer siglo D.C. [10]. Esta industria y su desarrollo más notable coinciden con la apertura de nuevas rutas comerciales y la invención del vidrio soplado en el siglo I AC [7], donde se preservaban mejor los perfumes que en las superficies porosas de los ungüentarios cerámicos.

Las perfumerías eran muy comunes en las ciudades del imperio [2]. El mercado del perfume es un espacio donde se paseaba y se reunían diferentes clases sociales. Situado cerca del foro, era parte de la vida cotidiana en todas sus dimensiones. La producción de perfumes no era un mo-

nopolio estatal y la figura del perfumista era un artesano que podría asimilarse actualmente a nuestro farmacéutico [1]. No parece sin embargo que esta profesión tuviera una alta consideración dentro de la sociedad pero sus negocios eran prósperos y muy populares [12].

4.3. Recreaciones-

Pero, ¿cómo olían? Uno de los problemas a la hora de abordar este tema es que las técnicas analíticas no pueden ofrecer una información completa. Los ungüentarios aun conservan restos de las fragancias, pero los compuestos aromáticos se han perdido totalmente. Sin embargo todavía es viable analizar la fracción más pesada de los componentes orgánicos como son los aceites, grasas y resinas naturales. A partir de este punto es necesario recurrir a textos antiguos, iconografía y vestigios de las excavaciones arqueológicas para avanzar. Se han realizado ensayos recreando varios tipos de fragancias muy celebres en ese tiempo como el *lasmelaion*, perfume de jazmín descrito por Dioscórides [1] [8].

5. RESULTADOS

Las hipótesis formuladas por los arqueólogos sobre las materias primas y los procesos de fabricación de los perfumes se ven refrendadas en los laboratorios. Los análisis de contenidos orgánicos aún no son sistemáticos, pero su uso se está extendiendo. Son datos valiosos pero parciales que dependen de los protocolos de muestreo, de la elección, número y conservación de los objetos y de las estructuras a muestrear. Los resultados logrados en las recreaciones han sido interesantes y fueron analizados mediante microextracción en fase sólida asociada a cromatografía de gases con espectrometría de masas (HS-SPME) y (GC-MS) [1] [6]. Aunque se ha tratado de respetar al máximo los procedimientos tradicionales hay varios hándicaps, los perfumistas guardaban las formulaciones en secreto y los pocos textos que las detallan no definen bien ni las cantidades ni materias primas. Además, no existía una nomenclatura botánica estandarizada, por lo que la identificación de las especies resulta complicada.

6. CONCLUSIONES

Tras este repaso se constata la necesidad de un enfoque pluridisciplinar en la investigación de este campo. Todas las ciencias y técnicas se complementan y ayudan a afirmar o a abrir nuevos caminos en un problema arqueológico eminentemente complejo. Los datos resultantes de los análisis químicos y biológicos han de ser interpretados para ponerlos en un contexto histórico y dotarlos de significación. Arqueólogos, filólogos, botánicos, químicos y perfumistas deben trabajar coordinados para poder estudiar y comprender este complejo mundo. Es un gran ejemplo de cómo la ciencia gracias una visión integradora del trabajo logra traer del pasado algo que se piensa imposible de recuperar, un aroma.

REFERENCIAS

- [1] C. Castel, X. Fernandez, J.-J. Filippi y J.-P. Brun, "Antique perfumery in the Mediterranean area" *L'Actualité chimique*, nº 359, pp. 42-49, 2012.
- [2] M. Bustamante y A. Ribera, "Production Moments and Areas in a Big House in Pompeii: The House of Ariadne from the 2nd Century BC to AD 79," de *Approaches to the Analysis of Production Activity at Archaeological Sites*, Oxford, Archaeopress Publishing, 2020, pp. 25-39. ISBN 978-1-78969-558-8
- [3] E. Ribechini, F. Modugno, C. Baraldi, P. Baraldi y M. P. Colombini, "An integrated analytical approach for characterizing an organic residue from an archaeological glass bottle recovered in Pompeii (Naples, Italy)," *Talanta*, nº 4, pp. 555-561, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.06.026>
- [4] D. Frère, E. Dodinet y N. Garnier, "L'étude interdisciplinaire des parfums anciens au prisme de l'archéologie, la chimie et la botanique: l'exemple de contenus de vases en verre sur noyau d'argile" *ArcheoSciences*, nº 36, pp. 47-70, 2012. doi: <https://doi.org/10.4000/archeosciences.3727>
- [5] M. I. d. I. Parfumerie, *Parfums Antiques: de l'archéologue au chimiste*, Grasse: Musée International de la Parfumerie, 2016.
- [6] X. Fernandez, "Les parfums dans l'Antiquité: Luxe et innovations," *Conférence olfactives: Maison Fragonard*, Paris, 2019.
- [7] R. Erika, M. P. Colombini, R. P. Evershed, F. Modugno y E. Ribechini, "Gas chromatographic and mass spectrometric investigations of organic residues from Roman glass unguentaria," *Journal of Chromatography*, nº 1183, pp. 158-169, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchroma.2007.12.090>. Ac
- [8] L. RONAT, Dirección, *Perfume Regained*. [Película]. Francia: CNRS Images, 2012.
- [9] A. Ribera y E. Huguet, "Los ungüentarios," *Manual de cerámica romana. Del mundo Helenístico al Imperio Romano*, Alcalá de Henares, Museo Arqueológico Regional, 2013, pp. 191-197. ISBN 978-84-451-3455-9
- [10] J.-P. Brun, C. Guilhem, M. Bustamante y A. Ribera, "Pompéi: Programme de recherches sur l'artisanat antique," 19 12 2012. doi: 10.4000/cefr.540 .
- [11] M. Flohr, "Artisans and Markets: The Economics of Roman Domestic Decoration," *American Journal of Archaeology*, vol. 123, nº 1, pp. 101-125, 2019 doi: 10.3764/aja.123.1.0101
- [12] J.-P. Brun, "Une parfumerie romaine sur le forum de Paestum," *Mélanges de l'École française de Rome. Antiquité*, vol. 110, nº 1, pp. 419-472, 1998 <https://doi.org/10.3406/mefr.1998.2032>
- [13] A. Ribera, E. García, M. Bustamante, E. Huguet y J. M. Vioque, "Ánforas hispánicas en Pompeya. Materiales de la casa de Ariadna y el macellum," *Monografías ex officina hispana*, nº III, pp. 569-586, 2016. ISBN: 978-84-942034-6-6



María Matesanz-Benito es titulada en Conservación y Restauración de Bienes Culturales especialidad en Documento Gráfico por la ESCRBC y Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid. Actualmente cursa el Máster de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide.