

Encuentros en la **b**iología



Regeneración de cartílago
auricular con terapia celular

Métodos de secuenciación:
3.^a generación

Dieta mediterránea

Vol XIII | No 175
OTOÑO | 2020

ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA

Revista de divulgación científica

Indexada en *Dialnet*

Entidad editora:

Universidad de Málaga. EDITADA CON LA COLABORACIÓN DE LA UNIDAD DE IGUALDAD DE GÉNERO DE LA UMA, DEL INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA "LA MAYORA" (IHSM-UMA-CSIC) Y EL DECANATO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

Depósito legal: MA-1.133/94

ISSN (versión electrónica): 2254-0296

ISSN (versión impresa): 1134-8496

Periodicidad:

4 NÚMEROS ORDINARIOS (TRIMESTRALES) Y AL MENOS
1 NÚMERO EXTRAORDINARIO MONOGRÁFICO AL AÑO

Correspondencia a:

JUAN ANTONIO PÉREZ CLAROS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
29071 - MÁLAGA
JOHNNY@UMA.ES

EQUIPO EDITORIAL

COMITÉ EDITORIAL EJECUTIVO

- Juan A. Pérez Claros
johnny@uma.es
Paleontología
Director.
- Ramón Muñoz-Chápuli
chapuli@uma.es
Biología del desarrollo y cardiovascular
*Director adjunto:
Coordinación de la edición electrónica, foros de la ciencia*
- Elena Rojano Rivera
elenarojano@uma.es
Bioinformática y biología de sistemas.
*Directora adjunta:
Maquetación*

COMITÉ EDITORIAL ASOCIADO

- Ana Grande Pérez
agrande@uma.es
Genética-virología,
Patogénesis virales.
Jóvenes científicos
- Antonio Diéguez
dieguez@uma.es

Filosofía de la ciencia

A debate, reseñaciones

- Beatriz Martínez Poveda
bmpoveda@uma.es
Biología molecular del cáncer y enfermedades cardiovasculares
- Enrique Viguera
eviguera@uma.es
Genética y genómica
Eventos especiales
- Francisco José Villena
francis.villena@icloud.com
Jóvenes científicos
- José M^a Pérez Pomares
jmperezp@uma.es
Biología del desarrollo y cardiovascular
Entrevistas
- M. Gonzalo Claros
claros@uma.es
Bioquímica, biología molecular y bioinformática.
Escribir bien no cuesta trabajo
- Miguel Á. Medina Torres
medina@uma.es

Biología molecular y de sistemas, biofísica y bioquímica
Monitor

- Belén Delgado Martín
belendm@uma.es
Bioquímica y biología molecular. *Maquetación*
- Jesús Olivero
jesusolivero@uma.es
Zoogeografía y biodiversidad animal
- Juan Antonio Guadix Domínguez
jaguadix@uma.es
Desarrollo embrionario, diferenciación celular y biología de células madre
- Juan Carlos Codina
jccodina@uma.es
Microbiología, educación secundaria
- Luis Rodríguez Caso
caso@eelm.csic.es
Técnicas de laboratorio
- María Rosa López Ramírez
mrlopez@uma.es
Química física,

astronomía

- Rafael Antonio Cañas Pendón
rcanas@uma.es
Biología Molecular de plantas
- A. Victoria de Andrés Fernández
deandres@uma.es
Biología animal aplicada
Directora de Ciencia Sin Límites
- Héctor Valverde Pareja
hvalverde@uma.es
Biología evolutiva molecular
Maquetación y difusión

COMITÉ EDITORIAL DE HONOR

- Salvador Guirado Hidalgo
guirado@uma.es
Biología Celular
- Esteban Domingo
edomingo@cbm.uam.es
Evolución de virus
- Gonzalo Álvarez Jurado
g.alvarez@usc.es
Genética

La portada



Hemos seleccionado la imagen de varios cuerpos fructíferos de hongos xilófagos para la portada de nuestro número de otoño de 2020. Los hongos, asociados típicamente al otoño, están integrados dentro del supergrupo Opisthokonta junto con los animales y algunas formas de protozoos flagelados. Dicho supergrupo tiene una antigüedad estimada de al menos 1000 millones de años, lo cual antecede en varios cientos de millones de años a la última glaciación global de la tierra que ocurrió en el periodo Criogénico. Esta imagen fue tomada por Rafael Cañas, editor de Encuentros en la Biología durante una visita a Japón.

Índice

Editorial	3
La imagen comentada	5
Terapia celular para regeneración de cartílago auricular	6
Métodos de secuenciación: tercera generación	15
40 años de la creación del Departamento de Bioquímica	22
Dieta mediterránea	25

Editorial

Aquí os presentamos el número de otoño de *Encuentros en la Biología*, como es ya nuestra costumbre, el último día de la estación. Con ello cerramos 2020, a cuya sombra han salido sus cuatro números ordinarios y dos extraordinarios (incluyo aquí el especial de 2019, cuya materialización tardó más de lo debido, a nuestro pesar). Es decir, hemos realizado un ciclo anual completo de la revista bajo la pandemia y seguimos bajo su oscuro manto.

La OMS se muestra cauta. Escuetas respuestas co-

mo «aún no», frente a la pregunta ¿tenemos ya una vacuna? son una muestra franca de cómo la web de la OMS trata el asunto, aunque las noticias de los últimos días están resultando esperanzadoras. Estimado lector, sin más atisbos que éstos nos toca seguir gestionando nuestra incertidumbre. Llegados aquí resulta paradójico, casi irrisorio, que la búsqueda «covid-19 vaccine» en Google Académico brinda 61.700 resultados en 0,05 segundos y eso... limitando los resultados sólo a 2020. Parece que nuestra ignorancia sobre la enfermedad só-

lo rivaliza con el número de artículos que publicamos al respecto. Un editorial no es el lugar, ni ahora es tampoco el momento, para abordar si en este caso, la información científica se está diluyendo en un número mayor de publicaciones que no aportan nada o casi nada nuevo. Muchos científicos parecen actuar como aquel banco central que cree que la riqueza del país aumenta al imprimir más moneda y lo que realmente ocurre en su lugar es que se diluye el valor del dinero. No obstante, en estas travesías bibliográficas también se descubre de vez en cuando algún caso donde al menos se afrontan con pericia las incertezas de estos tiempos sombríos. Aunque el mundo de la medicina sólo nos atañe en su vertiente biológica, quisiera compartir un breve párrafo de Devi Sridhar publicado el pasado 14 de noviembre en *The Lancet* con motivo de una reseña sobre el libro titulado «Cómo mantener la cordura en una época de división» de Elif Shafak. Dice así: «Sin embargo,

durante la pandemia, ha habido ansiedad por el virus y una considerable incertidumbre, con informes generalizados de problemas de salud mental y sentimientos de aislamiento, especialmente bajo encierro. Tal vez sea una ironía que cuando el mundo está sufriendo unido en esta pandemia, con los mismos debates y sacrificios sobre las restricciones que se están discutiendo en una multitud de idiomas, la gente se siente más sola que nunca». ¿Quién podría aventurar esto? Estar conectados no es lo mismo que estar acompañados. Pero la vida continúa, y de igual modo, nuestra tarea editorial. Aquí estamos, en <http://www.encuentros.uma.es>. Si nos buscas, estamos esperando tu visita para poder acompañarte en estos tiempos de incertidumbre.

Juan Antonio Pérez Claros

eb

La imagen comentada



Crédito de la imagen: Enrique Bellver Llorens (enriquebellver@telefonica.net), Ingeniero de Telecomunicaciones y Juan Antonio Guadix Domínguez (jaguadix@uma.es). Profesor Contratado Doctor. Departamento Biología Animal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos, 29071, España.

LA HORMIGA LEÓN

Las hormigas león o antlions son insectos del Orden *Endopterygota*, Familia *Myrmeleontidae*, que presentan metamorfosis completa, con estadios de larva, pupa e imago (adulto). Se caracterizan porque los individuos durante su fase larva son capaces de realizar trampas con forma de cono en la arena, que les ayudan a atrapar y así poder depredar otros pequeños artrópodos, principalmente hormigas. Durante la fase adulta su aspecto es similar a las libélulas, debido a la presencia de dos pares de alas membranosas con la presencia de numerosas nervaduras que forman un retículo (neurópteros).

En el año 2016 se publicó en la revista *Zootaxa*^[1] la aparición en el sur de la Península Ibérica y norte de Túnez de una nueva especie de hormiga león, al que denominaron *Myrmeleon almohadarum*. Estos insectos viven en zonas costeras, arenosas, dunas, cuencas de ríos con depósitos arenosos secos o riveras de ríos en zonas calurosas, siempre con arena. Sin embargo, esta fotogra-

fía fue tomada el pasado mes de agosto de este mismo año (2020) en el conjunto montañoso de relieve suave y redondeado de la Sierra de la Culebra, dentro del término municipal de San Pedro de las Herrerías-Mahide, de la provincia de Zamora. Esta zona se caracteriza por la presencia de torrenteras y pequeños cursos de agua con fuerte escorrentía superficial y el clima es de tipo mediterráneo continentalizado, caracterizado por inviernos fríos y largos y veranos cortos y cálidos. Por tanto, podemos pensar que estamos ante una nueva prueba de cómo el cambio climático está influyendo en la biogeografía de muchas especies.

Referencias

- [1] Davide Badano, Fernando Acevedo, Roberto A. Pantaleoni, Víctor J. Monserrat. *Myrmeleon almohadarum* sp. nov., from Spain and North Africa, with description of the larva (Neuroptera Myrmeleontidae). *Zootaxa* 4196 (2), 22 de noviembre de 2016. DOI: [10.11646/zootaxa.4196.2.2](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4196.2.2).
-

TERAPIA CELULAR PARA LA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO ARTICULAR por PATRICIA V. LÓPEZ GÓMEZ

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
PATRICIALOPEZ.BIO@GMAIL.COM

La reparación de las lesiones producidas en el cartílago articular es un problema no resuelto y de enorme importancia a nivel mundial. La terapia celular surge como respuesta a la necesidad de paliar los problemas ocasionados por la degeneración articular tras una lesión en el cartílago. La perspectiva de un enfoque interdisciplinario dota de gran relevancia a la ingeniería tisular y a la medicina regenerativa, revolucionando la manera en que los científicos abordan el problema. Las estrategias actuales, así como su posible traslación clínica y la posible dirección en el futuro de la investigación, serán discutidas en el siguiente texto.

Introducción

El tejido condral y, en especial, aquel que conforma las articulaciones, ha recibido una atención crítica debido a su papel esencial en el funcionamiento del aparato locomotor, a su gran susceptibilidad a la enfermedad y a su escasa capacidad de regeneración tras ser objeto de una lesión.

Actualmente, los esfuerzos clínicos para reparar el cartílago articular dañado enfrentan obstáculos importantes debido a la limitada capacidad de regeneración intrínseca del tejido y a las intervenciones, que resultan ser insuficientes para el paciente. Esto pone de manifiesto la imperiosa necesidad de mejorar la búsqueda de estrategias terapéuticas que pongan solución a la actual brecha existente con los tratamientos empleados hoy día^[1]

El objetivo del siguiente trabajo es realizar una revisión bibliográfica acerca del estado actual de esta cuestión, discutir las técnicas clínicas en uso y su progreso en las últimas tres décadas, así como dar a conocer las futuras estrategias de investigación más prometedoras para la regeneración del cartílago articular.

El cartílago como tejido

El cartílago hialino articular es un tejido avascular, aneural^[2] y alinfático^[3] que cubre los extremos de los huesos presentes en las articulaciones, proporcionando una superficie lisa y deslizante con un bajo

coeficiente de fricción, protegiéndolos de las cargas compresivas. Este tejido posee una organización y una composición únicas^[4], por lo que describir su estructura tridimensional es indispensable para comprender en su totalidad las complejas condiciones de difusión y permeabilidad que subyacen a su fisiología^[5].

El cartílago articular está conformado por condrocitos como componente celular y una matriz extracelular con agua, colágeno y proteoglicanos cargados negativamente^[6]. El agua es el componente mayoritario en el tejido, pudiendo representar hasta un 80 % de su peso total^[7]. El principal componente de la matriz extracelular es el colágeno de tipo II, conformando entre un 60 % - 70 % del peso seco, seguido por los proteoglicanos, que representan entorno al 20 % - 40 % del peso seco del tejido^[8].

Los condrocitos son células altamente especializadas, responsables de sintetizar y mantener toda la infraestructura y composición de la matriz y del propio cartílago^[6]. Representan tan solo entre el 1 % y el 5 % del volumen total del tejido, y son capaces de nutrirse mediante un proceso de difusión a través del líquido sinovial circundante y, en menor grado, a través de la placa subcondral^[3]. Mientras que el tejido es altamente celular e isotrópico al nacer, se desarrollan zonas únicas a medida que el tejido madura^[9]. Desde una perspectiva histológica, el cartílago articular adulto se organiza en 4 capas distintas: superficial, de transición, profunda y calcificada. Cada una de ellas aporta características y propiedades biomecánicas necesarias para que el cartílago articular pueda soportar cargas y funcionar con la menor fricción posible^[6].

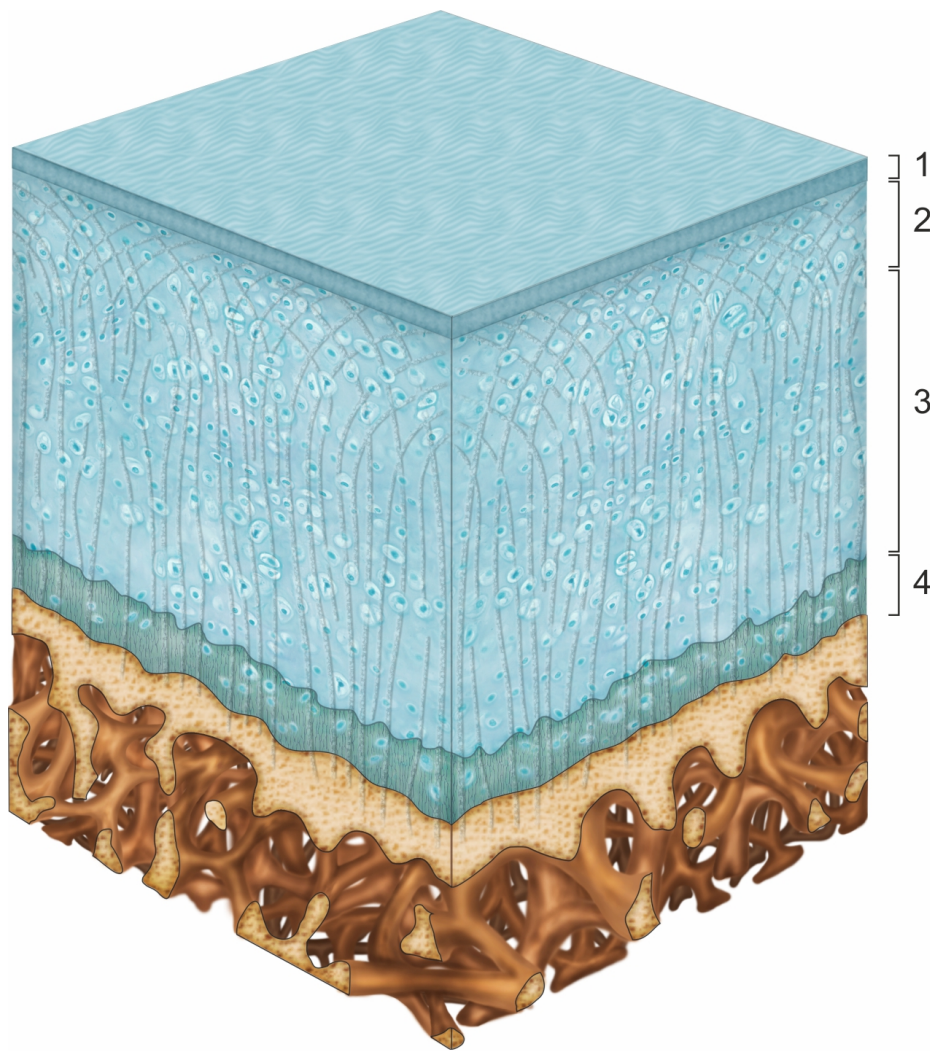


Figura 1. Representación gráfica de las capas y composición del cartílago articular y tejido subcondral: 1, capa superficial. 2, capa de transición. 3, capa profunda. 4, capa calcificada.

Patología del tejido condral

Debido a su condición avascular y a su baja tasa metabólica^[6] el cartílago articular posee una capacidad de regeneración intrínseca muy baja^[9]. La pérdida de macromoléculas, la rotura de la matriz de cartílago y la pérdida de la integridad de la propia articulación ocurren durante una lesión en el tejido condral^[10], por ello, la susceptibilidad a la enfermedad y a los trastornos asociados toma gran relevancia en la investigación biomédica^[1].

Numerosas lesiones se producen durante el transcurso de enfermedades articulares como la osteoartritis o la artritis reumatoide, o bien por una lesión traumática. El problema puede originarse directa o indirectamente: como consecuencia de una fractura intraarticular, un impacto de alta intensidad o después de una lesión muscular^[11].

La incidencia y la prevalencia de defectos condrales en algunas articulaciones son difíciles de de-

terminar. Dichas lesiones pueden ser de naturaleza silenciosa, pudiendo desarrollarse y acrecentarse con el paso del tiempo, resultando en defectos de mayor gravedad^[10,12]; por ello, una escala de calificación que permita medir y establecer el daño producido en el tejido articular es totalmente necesaria, con el fin de aproximarse tanto como sea posible a la realidad de la gravedad de la lesión^[6]. En consecuencia, la Sociedad Internacional para la Reparación del Cartílago estableció un sistema de clasificación en 4 grados que además tiene en cuenta la profundidad de la lesión articular^[6,13]:

- Grado 0 – Cartílago normal y sano
- Grado 1 – Casi normal
- Grado 2 – Anormal
- Grado 3 – Alterado
- Grado 4 – Gravemente alterado

Una vez que se ha evaluado y caracterizado la lesión mediante técnicas de diagnóstico de imagen, se puede elaborar un protocolo de tratamiento personal para cada paciente^[10]. Las personas con una baja actividad física y un tamaño de lesión pequeño pueden optar por someterse a un procedimiento

paliativo como tratamiento de primera línea^[14]. Por el contrario, un paciente de menor edad, pero con una mayor actividad física, aunque padezca el mismo tipo de lesión en el tejido, debería someterse a tratamientos de «segunda línea» para la reparación del tejido condral dañado^[6].

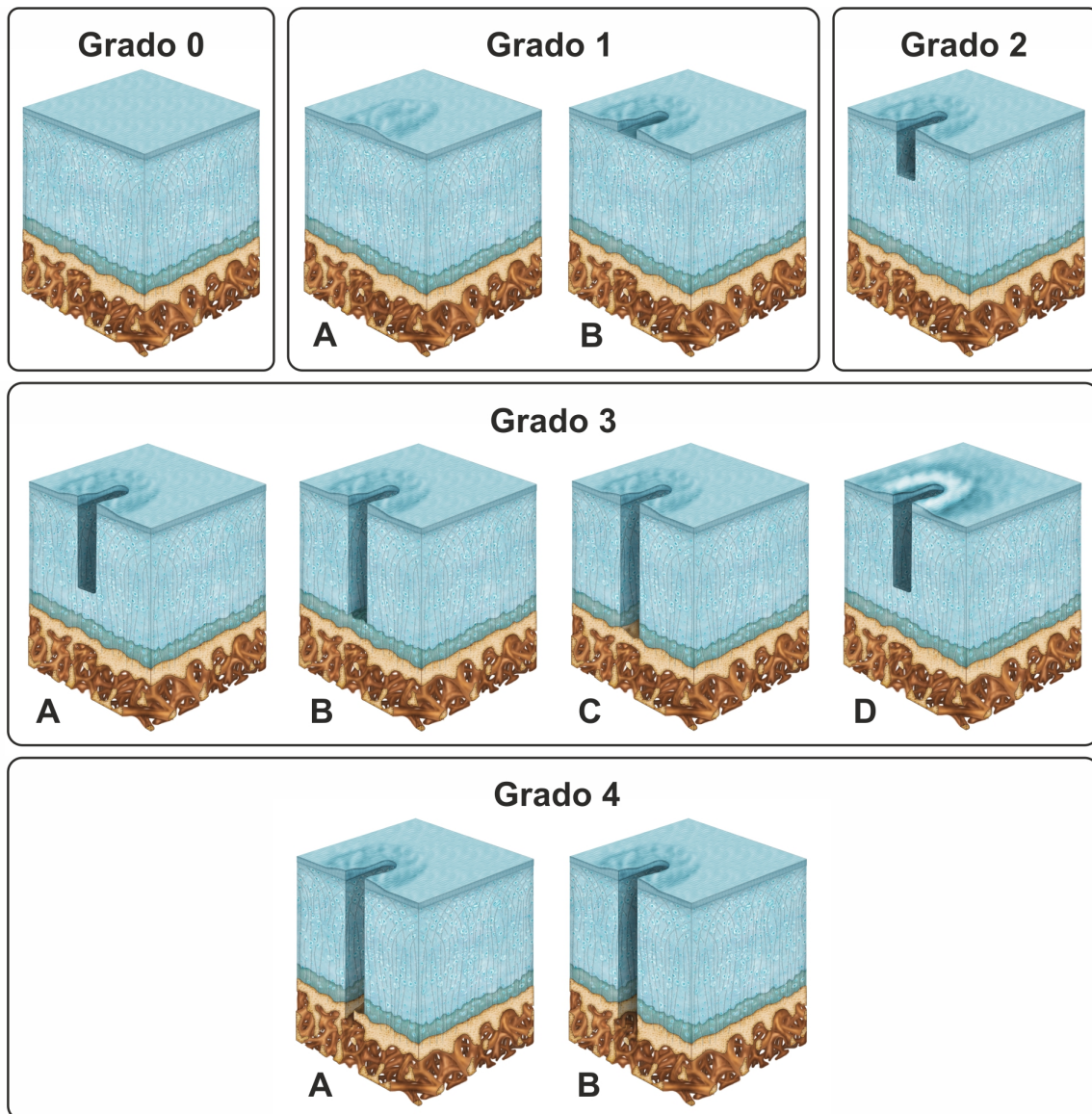


Figura 2. Representación gráfica del algoritmo de lesión condral previamente descrito. Grado 0: cartílago sano. Grado 1: A, daño superficial. B, laceración superficial. Grado 2: daño menor del 50% de profundidad. Grado 3: A, daño mayor del 50% sin alcanzar la capa calcificada. B, daño hasta la capa calcificada. C, compromiso de la capa subcondral. D, ampolla en la capa superficial. Grado 4: Lesiones graves: A, abarca la placa ósea subcondral. B, defecto muy profundo hasta el hueso trabecular.

Estrategias actuales para el tratamiento de la lesión de cartílago.

Actualmente existe un amplio número de técnicas que pueden ser empleadas en el tratamiento de las lesiones de cartílago articular^[15]. Cada técnica tiene criterios específicos, en los que además de las características de la lesión, se incluyen otros factores como la experiencia del cirujano, la edad del paciente, la cronicidad, y la existencia de patologías y/o enfermedades previas, etc.

Las estrategias operativas se pueden agrupar en técnicas paliativas, reparadoras y restaurativas. Las técnicas de «primera línea» son aquellas en las que se establece un tratamiento paliativo, aconsejado para lesiones de menor tamaño y para pacientes con una baja demanda física. Por otro lado, para pacientes con una alta demanda física (aquellos en los que el tratamiento paliativo ha resultado fallido) puede ser más indicada una estrategia «de segunda línea»^[6].

Las técnicas denominadas de «estimulación de la médula ósea» dan como resultado la formación de fibrocartílago: mediante microperforaciones de la placa subcondral, para la formación de un «supercoágulo», que posteriormente dará lugar a tejido nuevo en el área dañada. Por otro lado, otras metodologías intentan reemplazar el cartílago dañado mediante el trasplantes de injertos osteocondrales o bien, mediante el implante de condrocitos autólogos^[10,15].

Lavado y desbridamiento artroscópico

El desbridamiento artroscópico incluye el alisado de la superficie articular fibrilada, el afeitado de los osteofitos que restringen el movimiento debido a su alta proliferación y la eliminación del sinovio inflamado en el tejido condral. El desbridamiento puede realizarse en combinación con otros procedimientos como la abrasión, la meniscectomía, la sinovectomía o la osteotomía. El lavado de la articulación con una solución salina^[16] elimina los fragmentos de cartílago o posibles cuerpos sueltos, desechos o posibles cristales que pueden quedar en la articulación^[6].

Estimulación medular por microfractura

En esta técnica se crean bordes verticales y estables a lo largo del cartílago, efectuando perforaciones con aproximadamente 2 mm de separación entre ellas, hasta penetrar el hueso subcondral. La perforación de la placa subcondral promueve el sangrado y la migración local de células pluripotentes y otros factores de señalización que contribuyen a la formación de un «supercoágulo». El bajo costo y la relativa simplicidad de esta técnica, que puede realizarse artroscópicamente^[17], han favorecido su uso extendido. La principal desventaja de esta técnica incluye la aparición de un tejido cartilaginoso con capacidad de regeneración limitada, dando como resultado una futura degeneración estructural y funcional del tejido generado^[14,17].

Técnicas de trasplante

Autoinjerto osteocondral

El procedimiento de trasplante de autoinjerto osteocondral, también denominado mosaicoplastia, está indicado para lesiones menores de 2x2 cm en una articulación que no se encuentre en proceso de degeneración y en pacientes jóvenes. Por lo general, es un tratamiento de segunda línea, y se emplea tras haber realizado al menos un desbridamiento artroscópico. Esta técnica se puede llevar a cabo mediante artroscopia o una pequeña artrotomía.

Aloinjerto osteocondral

Cuando es necesario reparar lesiones condrales de mayor tamaño, en las que la placa subcondral se ha visto comprometida, se recurre al trasplante mediante aloinjerto; esta técnica requiere de una mayor cantidad de tejido, lo que compromete la integridad de la articulación, siendo necesaria su obtención del cuerpo sin vida de un donante^[10]. Dicha técnica se puede realizar por vía artroscópica, pero con más frecuencia requiere una artrotomía^[14]. Las desventajas del trasplante de aloinjertos incluyen la disponibilidad del injerto, la viabilidad celular con fecha límite y el riesgo de transmisión de patógenos^[10].

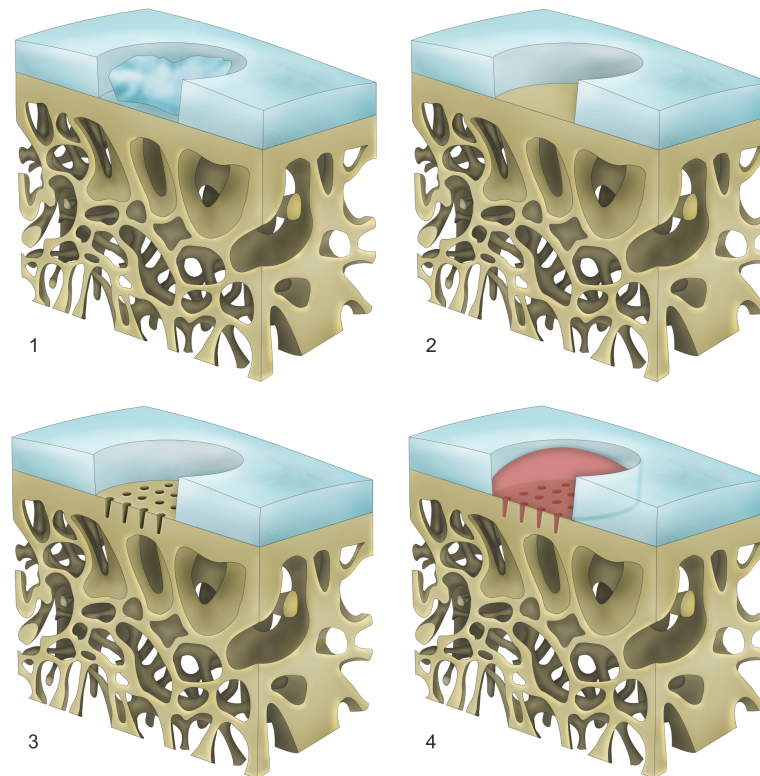


Figura 3. Representación gráfica del tratamiento de la lesión condral mediante la técnica de microfracturas: 1, cartílago articular dañado. 2, desbridamiento y lavado de la zona condral dañada. 3, realización de las microperforaciones pertinentes hasta el hueso subcondral. 4, formación del coágulo que posteriormente dará lugar al nuevo tejido de reparación.

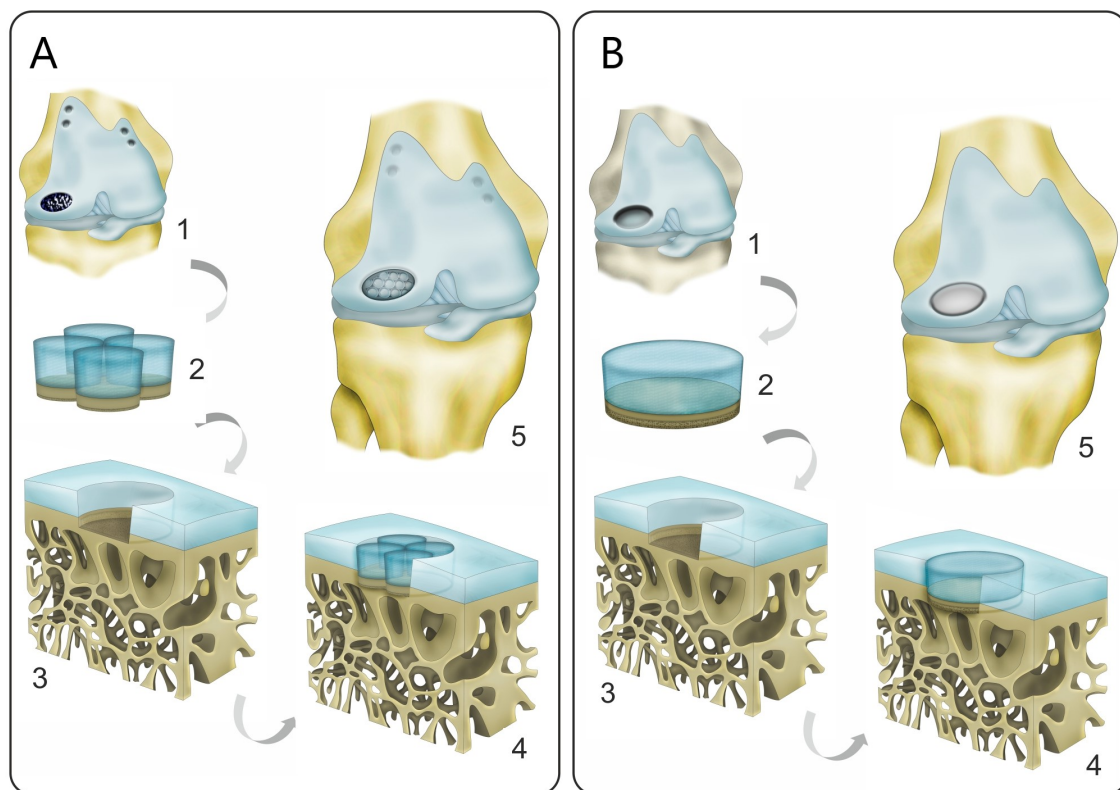


Figura 4 En el panel A, representación gráfica del proceso de autoinjerto osteocondral (mosaicoplastia). 1, extracción de tejido osteocondral de la rodilla afectada. 2, preparación del implante. 3, lavado de la zona dañada y preparación del injerto. 4, Implante del tejido osteocondral en la zona afectada. 5, resultado final y reparación posterior de la zona afectada. En el panel B, representación gráfica del procedimiento de aloinjerto osteocondral para el tratamiento de una lesión articular. 1, extracción del injerto del donante. 2, preparación del implante. 3, lavado de la zona afectada, 4, colocación del injerto osteocondral. 5, resultado final y posterior reparación del tejido en la zona condral afectada.

Implantación de condrocitos autólogos

A mediados de la década de los 90, fue propuesto por primera vez el trasplante autólogo de condrocitos, mayormente conocido como «ACI», por sus correspondientes siglas en inglés^[18]. Es una técnica que por primera vez es capaz de unir las metodologías quirúrgicas clásicas y los cultivos celulares, para el tratamiento de lesiones en el cartílago^[10]. Se emplea a menudo para el tratamiento de lesiones condrales mayores de 2x2 cm^[19], e incluso está indicada para tratar lesiones especialmente profundas^[20].

La metodología está claramente dividida en 2 pasos: primero es necesario realizar una recolección de los condrocitos mediante una biopsia previa de cartílago articular^[19]. En una segunda etapa, se cultivan y se expanden las células, y, una vez obtenida la cantidad necesaria, se implantan en el paciente: se depositan los condrocitos cultivados sobre el hueso

subcondral, se recubre el implante con una membrana y para finalizar se sella con fibrina.

La evolución de dicha técnica ha pasado por diferentes fases, que pueden ser designada como «generaciones»^[10]:

- El ACI de primera generación es aquel en el que se emplea un parche perióstico extraído del propio hueso del paciente, el cual evita evita la salida de los condrocitos inyectados de la zona afectada y facilita la formación de tejido nuevo^[21].
- El ACI de segunda generación es el denominado Implante de condrocitos autólogos inducidos por membrana, «MACI», por sus siglas en inglés. En esta técnica, las células se depositan en el interior de una membrana capaz de adherirse al hueso subcondral, facilitando enormemente el procedimiento quirúrgico, ya que puede realizarse mediante artroscopía, siendo innecesarias las suturas y el empleo del periostio^[10].

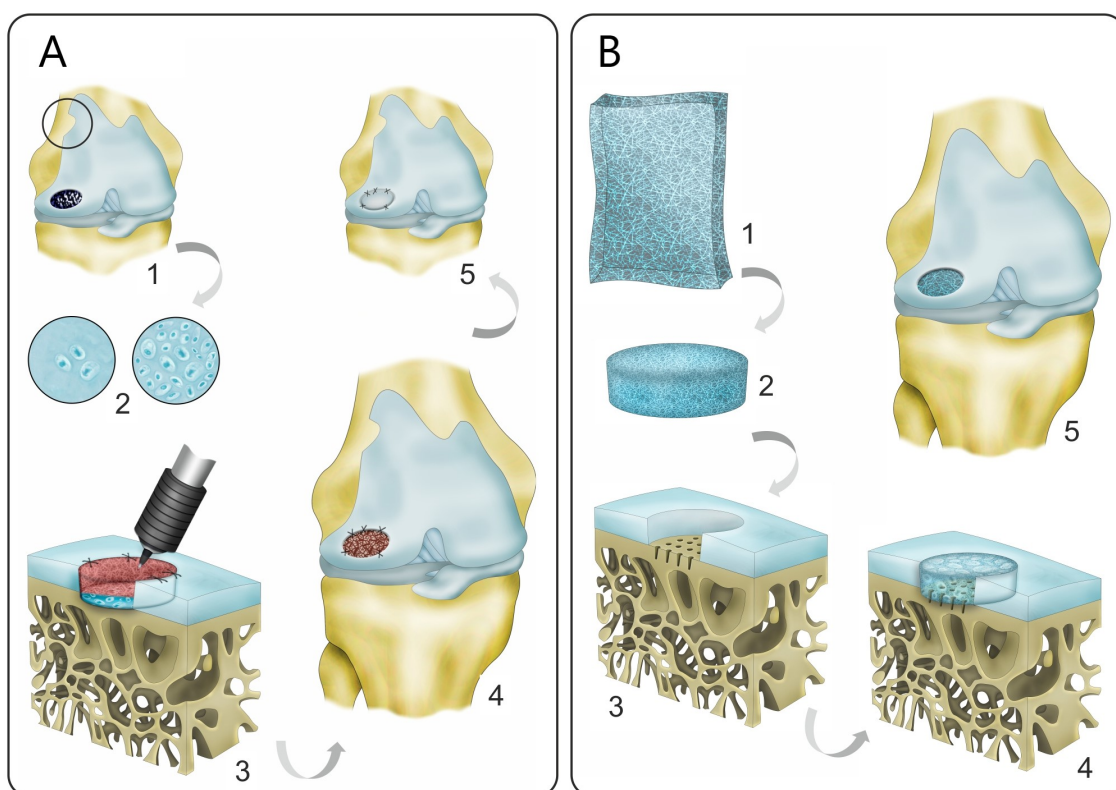


Figura 5. En el panel A, representación gráfica del procedimiento a realizar en la técnica de implante de condrocitos autólogos (ACI). 1, extracción de una porción de cartílago articular del paciente. 2, cultivo y expansión de los condrocitos. 3, implante de condrocitos en la zona afectada, sellado y sutura. 4, resultado final tras el implante. 5, reparación posterior de la zona condral dañada. En el panel B, representación gráfica del proceso para implantación de condrocitos autólogos mediados por membrana (MACI). 1, preparación de la malla. 2, extracción y preparación de la membrana con condrocitos. 3, protocolo realizado junto con el proceso de microfractura. 4, colocación de la membrana y estabilización de las células presentes en la herida. 5, resultado final y reparación posterior.

Comparativa y limitaciones actuales

En general, lesiones pequeñas se tratan mejor con técnicas clásicas como la microfractura o la mosaicoplastia. Por otro lado, las lesiones de un tamaño intermedio han mostrado unos resultados similares utilizando las opciones de mosaicoplastia como el implante de condrocitos autólogos. Para lesiones mucho más profundas, el implante de condrocitos autólogos (ACI/MACI) o el aloinjerto osteocondral han mostrado los mejores resultados^[20].

Una de las principales necesidades de investigación es el seguimiento a largo plazo de la metodología de implantes ACI/MACI, ya que, como consecuencia de su rápida evolución en la última década, los datos a largo plazo en su mayoría provienen de ensayos en los que se han empleado protocolos de ACI que ahora están siendo reemplazados por otros mucho más novedosos y prometedores^[22].

Estrategias de futuro

Las opciones de tratamiento discutidas hasta ahora han dado como resultado la formación de fibrocartílago de forma total o predominante sobre la formación de cartílago hialino propiamente dicho^[20].

La limitada capacidad de regeneración en las lesiones del tejido condral y la morbilidad asociada con transferencia de hueso y cartílago^[9] hacen muy atractiva la búsqueda de técnicas que propicien la regeneración del cartílago como una alternativa que pueda acabar reemplazando por completo a las técnicas empleadas hasta la fecha. El futuro de la gestión de los defectos del cartílago se encuentra en el planteamiento de soluciones a través de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos^[4,6,23].

Se puede definir la ingeniería de tejidos como la técnica que busca reconstituir tejidos, tanto a nivel estructural como funcional. Dicha técnica puede realizarse completamente *in vitro*, inicialmente *in vitro* y luego *in vivo* (*in situ*), o bien realizarse completamente *in vivo*^[24]. Tres son los elementos constituyentes que forman las piezas básicas de un enfoque basado en la ingeniería de tejidos: un aporte celular, un andamio matricial, y moléculas de señalización^[24].

Las combinaciones de estos 3 elementos impulsan las principales vías de regeneración de cartílago que existen actualmente, las denominadas «estrategias de tercera y cuarta generación»^[10]:

1. Implantes basados en andamios que promueven el reclutamiento de células con moléculas señalizadoras (sin aporte celular externo).
2. Andamios en adición de células que imitan la arquitectura del tejido nativo.
3. Técnicas basadas únicamente en células, sin andamiaje matricial^[1].

Fuente celular

Existen células precursoras con un origen diverso de numerosos tejidos de mamíferos que tienen la capacidad de diferenciarse en condrocitos, para posteriormente ser empleadas en técnicas de trasplante de tejido condral. Las células madre constituyen un grupo de células indiferenciadas con alto potencial de regeneración, capacidad ilimitada para la división y capacidad de autorregeneración^[1,24].

En los últimos años, se han recolectado células madre con un gran potencial condrogénico de una variedad de tejidos, incluyendo la médula ósea, tejido adiposo, piel, folículos pilosos, periostio, pericondrio, músculo esquelético, membrana sinovial, pulpa dental e incluso del propio cartílago maduro^[24].

Biomateriales

La gran mayoría de las nuevas técnicas de ingeniería tisular en el ámbito de la reparación de las lesiones de cartílago articular utilizan biomateriales, que ayudan a soportar y crear estructuras similares a las de la matriz condral. En estas metodologías se busca optimizar ciertos aspectos entre los que se incluyen la biocompatibilidad en la articulación, la toxicidad, la tasa de degradación, la rigidez, el tamaño y la arquitectura obtenida^[25].

Los andamiajes fabricados a partir de proteína natural (como por ejemplo colágeno o fibrina) o bien de polisacáridos (como por ejemplo agarosa o ácido hialurónico) se caracterizan por una buena biocompatibilidad y biodegradabilidad. Es importante señalar que las superficies de estos biomateriales naturales contienen ligandos que son reconocidos por receptores celulares en la articulación, lo que aumenta la adaptabilidad del injerto *in situ*, mientras que los andamios fabricados a partir de materiales artificiales destacan por sus propiedades mecánicas, de resistencia y claramente manipulables en función de las necesidades del injerto^[26].

Moléculas señalizadoras

Son las encargadas de guiar a las células en el transcurso de su diferenciación de una forma adecuada^[24]. Son moléculas activas que pueden estimular el

crecimiento a nivel celular y mejorar la condrogénesis con el fin de aumentar la reparación de las lesiones presentes en el cartílago.

En la mayoría de las estrategias en desarrollo, el tipo celular que se haya elegido se aplica en el tejido junto con factores de crecimiento libres o bien encapsulados de una forma adecuada^[20].

Discusión y conclusión

La reparación de las lesiones producidas en el tejido condral articular ha evolucionado notoriamente en las últimas 3 décadas: aunque actualmente existen tratamientos capaces de paliar y restaurar parcialmente las lesiones producidas en el cartílago a corto y medio plazo, han surgido grandes expectativas de cara a un futuro próximo.

Sin embargo, una sola estrategia podría no ser suficiente para hacer frente de forma efectiva a las lesiones en un estado más avanzado: la ingeniería tisular y la medicina regenerativa han revolucionado la manera en que los científicos son capaces de abordar la reparación y regeneración del cartílago articular gracias a la introducción del concepto del enfoque interdisciplinar; nuevas estrategias de futuro que integran una combinación de diferentes fuentes celulares, con nuevos biomateriales junto con la liberación de determinadas moléculas activas.

La traslación clínica de muchas de estas técnicas ha ofrecido grandes ventajas para el paciente: el desarrollo de un tratamiento totalmente personalizado y capaz de solventar con precisión daños articulares de gran complejidad. Sin embargo, para la traslación clínica de las nuevas terapias celulares y activos biológicos aún existen múltiples obstáculos que deben superarse antes de su puesta en valor en dimensiones clínicamente relevantes, no solo porque requiere de una fabricación celular costosa y segura, sino porque el tratamiento al paciente es crítico, y requiere de una revisión y regulación a todos los niveles; siendo imprescindible la comunicación entre médicos e investigadores, para obtener resultados efectivos y eficaces que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

A pesar de que aún no encajan todas las piezas que conforman este gran puzzle, este nuevo enfoque supone una gran promesa para la investigación: futuras tecnologías de nueva generación, emergentes y en desarrollo son las herramientas más poderosas para afrontar los problemas de hoy día.

Referencias

- [1] K. L. Caldwell and J. Wang. Cell-based articular cartilage repair: the link between development and regeneration. *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 23, no. 3, pp. 351–362, 2015.
- [2] M. Huber, y otros. Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest. Radiol.*, vol. 35, no. 10, pp. 573–580, 2000.
- [3] A. M. Bhosale and J. B. Richardson. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.*, vol. 87, no. 1, pp. 77–95, 2008.
- [4] D. Correa and S. A. Lietman. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 67–77, 2017.
- [5] E. B. Hunziker, y otros. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 10, no. 7, pp. 564–572, 2002.
- [6] E. S. Tetteh, y otros. The Basic Science and Surgical Treatment Options for Articular Cartilage Injuries of the Knee. *J. Orthop. Sport. Phys. Ther.*, vol. 42, no. 3, pp. 243–253, 2012.
- [7] F. S. Chen, y otros. Repair of articular cartilage defects: part I. Basic Science of cartilage healing. *Am. J. Orthop.*, vol. 28, no. 1, pp. 31–33, 1999.
- [8] J. K. Suh, y otros. Basic science of articular cartilage injury and repair. *Oper. Tech. Sports Med.*, 1995.
- [9] R. S. Decker. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 50–56, 2017.
- [10] E. Álvarez, y otros. Cartilage repair, possibilities and results. *Trauma*, vol. 21, pp. 117–134, 2010.
- [11] T. Pap and A. Korb-Pap. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis—two unequal siblings. *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 11, no. 10, pp. 606–615, Oct. 2015.
- [12] J. R. Steadman, y otros. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*, vol. 19, no. 5, pp. 477–484, 2003.
- [13] M. M. Mata-Miranda, y otros. Implante de condrocitos autólogos con potencial regenerativo en lesiones articulares. *Rev. Colomb. Ortop. y Traumatol.*, 2015.
- [14] B. J. Cole, y otros. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 91, no. 7, pp. 1778–1790, Jul. 2009.
- [15] A. W. Anz, y otros. Concepts in regenerative medicine: Past, present, and future in articular cartilage treatment. *J. Clin. Orthop. Trauma*, vol. 7, no. 3, pp. 137–144, 2016.
- [16] Medical Advisory Secretariat. Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee: an evidence-based analysis. *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* vol. 5, no.12, pp. 1-37, 2005.
- [17] K. Rönn, y otros. Current surgical treatment of knee osteoarthritis. *Arthritis*, vol. 2011, p. 454873, 2011.
- [18] M. Brittberg, y otros. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 14, pp. 889–895, 1994.
- [19] C. B. Foldager. Advances in autologous chondrocyte implantation and related techniques for cartilage repair. *Dan. Med. J.*, vol. 60, no. 4, p. B4600, 2013.
- [20] D. L. Richter, y otros. Knee Articular Cartilage Repair and Restoration Techniques: A Review of the Literature. *Sports Health*, vol. 8, no. 2, pp. 153–160, 2016.
- [21] E. V Medvedeva, y otros. Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 8, 2018.
- [22] H. Mistry, y otros. Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.*, vol. 21, no. 6, pp. 1–294, 2017.

-
- [23] E. R. Vina and C. K. Kwok. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr. Opin. Rheumatol.* vol. 30, no. 2, pp. 160–167, 2018.
- [24] E. B. Hunziker y otros. An educational review of cartilage repair: precepts & practice—myths & misconceptions—progress & prospects. *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 23, no. 3, pp. 334–350, 2015.
- [25] S. L. Francis y otros. Cartilage Tissue Engineering Using Stem Cells and Bioprinting Technology—Barriers to Clinical Translation. *Front. Surg.*, vol. 5, p. 70, 2018.
- [26] B. Zylinska y otros. Treatment of Articular Cartilage Defects: Focus on Tissue Engineering. *In Vivo*, vol. 32, no. 6, pp. 1289–1300, 2018.
-
-

MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN: TERCERA GENERACIÓN

por JOSÉ MIGUEL VALDERRAMA MARTÍN*, FRANCISCO ORTIGOSA* Y RAFAEL A. CAÑAS⁺*ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR, 4^A PLANTA EDIFICIO I+D, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071.⁺PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA, 4^A PLANTA EDIFICIO I+D, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071.

J.M.VALDERRAMA@UMA.ES, F.ORTIGOSA@UMA.ES, R.CANAS@UMA.ES

Las primeras técnicas de secuenciación masiva de ácidos nucleicos (2.^a generación) han permitido un extraordinario desarrollo de la Genómica y su «democratización». Sin embargo, presentan una serie de flaquezas, principalmente su incapacidad para generar lecturas mayores de 1 kb y la necesidad de amplificación previa de las muestras. En los últimos años se han desarrollado las denominadas como técnicas de secuenciación de tercera generación, las cuales han venido a paliar algunos de los defectos de las tecnologías precedentes. Por un lado, estas técnicas permiten obtener tamaños medios de lecturas de 30 kb, con máximos de 2,3 Mb. Por otro lado, no necesitan amplificación previa de las muestras de ácidos nucleicos, por lo que no se pierden las marcas epigenéticas que puedan presentar. Además, estas técnicas de tercera generación realizan la secuenciación directa del ARN, algo que no es posible con las técnicas precedentes. Así mismo, abren un nuevo camino en la secuenciación de ácidos nucleicos, sentando un nuevo precedente en el desarrollo de las Ciencias Genómicas hasta ahora desconocido.

The first techniques for massive sequencing of nucleic acids (2nd generation) have allowed an extraordinary development of Genomics and its «democratization». However, they present a series of weaknesses, mainly their inability to generate readings greater than 1 kb and the need for prior amplification of the samples. In recent years, so-called third-generation sequencing techniques have appeared, alleviating some of the shortcomings of previous technologies. On the one hand, they average read size reaches 30 kb, with maximums of 2.3 Mb in a read. On the other hand, they do not need prior amplification of the nucleic acid samples, so the epigenetic marks that they may present are not lost. In addition, these third generation sequencing techniques can also perform direct sequencing of RNA, which is not possible with the preceding techniques. Thus, they point to a new path in nucleic acid sequencing, setting a new precedent in genomic science development unknown until now.

Palabras clave: secuenciación, tercera generación, SMRT, PacBio, Oxford Nanopore, MinION.

Enviado: 05/05/2020

Keywords: sequencing, third generation, SMRT, PacBio, Oxford Nanopore, MinION.

Aceptado: 31/10/2020

Las tecnologías de secuenciación de ácidos nucleicos de 2.^a generación han revolucionado la Biología durante los últimos 15 años. Su alto rendimiento y fidelidad de las lecturas han permitido el impulso definitivo de la Genómica tanto a nivel estructural (secuenciación de genomas) como funcional (por ejemplo, análisis transcriptómicos o epigenómicos) reduciendo los gastos al punto de poder secuenciar el genoma humano por menos de 1.000^[1]. De todos los métodos de secuenciación de 2.^a generación es el de Illumina el que se sitúa como referente o estándar actual en cuanto a secuenciación masiva de ácidos nucleicos, representando mejor que ninguna otra plataforma las fortalezas y debilidades de estas tecnologías. Con respecto a sus principales debilidades está el reducido tamaño de las lecturas que producen (hasta 300 pb) lo que aumenta la probabilidad de producir errores

de ensamblaje. Cuanto más pequeñas son las lecturas, más fácil es encontrar porciones de secuencia comunes a dos lecturas sin que estas pertenezcan a un mismo fragmento genómico o transcrito. En el caso de transcritomas se pueden producir numerosas secuencias quiméricas (producto del ensamblaje de secuencias procedentes de dos o más genes diferentes). En este sentido los procesos de ajuste alternativo (*alternative splicing*) son una gran fuente de perturbación de los ensamblajes transcriptómicos provocando ensamblajes de secuencias que no se dan en la realidad. En el caso de los ensamblajes de genomas, las secuencias de pequeño tamaño, cuando se usa estrategias de secuenciación no basadas en mapas genéticos o físicos, pueden dar lugar a ensamblajes muy fragmentados del genoma. Esto sucede principalmente en el caso de genomas eucariotas de gran tamaño y con

un alto porcentaje de secuencias repetitivas como retrotransposones^[2]. Por otro lado, las lecturas de pequeño tamaño también pueden llevar a problemas en la identificación de especies filogenéticamente cercanas en análisis metagenómicos de microorganismos. Otra flaqueza de estos métodos es la necesidad de amplificar la muestra de ácidos nucleicos previamente a la secuenciación, por lo que siempre se secuencian copias de las moléculas originales. Esto hace que se pierdan las modificaciones químicas, marcas epigenéticas, de los nucleósidos y, por tanto, generan la necesidad de aproximaciones previas y complementarias a la secuenciación para poder determinar la posición de estas modificaciones^[3].

Desde un punto de vista tecnológico, el impulso creado por la aparición de las tecnologías de 2.^a generación ha propiciado el desarrollo de nuevos métodos que han intentado solventar los dos principales problemas de estos métodos descritos anteriormente: el tamaño de las lecturas y el uso directo de la muestra de ácidos nucleicos sin amplificar. A estos nuevos métodos se les ha denominado secuenciación de tercera generación. Entre sus características generales está la generación de lecturas de gran tamaño, una secuenciación monitorizada a tiempo real y no necesitan la amplificación previa de los ácidos nucleicos, siendo capaces de detectar modificaciones químicas de las bases nitrogenadas tanto de ADN como de ARN. A pesar de estas ventajas, estas tecnologías de secuenciación de 3.^a generación presentan dos grandes inconvenientes. El primero es que la cantidad de lecturas (cobertura) que pueden generar sigue siendo muy reducida en comparación con las que producen las tecnologías de secuenciación de segunda generación como Illumina. El segundo y principal problema de estas tecnologías es su menor fidelidad, siendo las tasas de acierto de hasta un 99,8 % (Q27) para PacBio^[4] y hasta un 95 % (Q13) para Oxford Nanopore^[5], las cuales son menores en comparación con las de tecnologías de segunda generación, cuyas tasas de fidelidad son cercanas al 99.99 % (>Q35). Esto es un condicionante muy importante para su desarrollo y expansión comercial a campos de estudio diferentes a la Genómica estructural, donde por el momento presentan sus mejores resultados. Gracias a su capacidad de generar lecturas largas pueden establecer guías robustas para realizar ensamblajes de calidad en especies con genomas grandes y repetitivos. Estos borradores genómicos, que por los inconvenientes de las técnicas previamente descritos no presentan una elevada fidelidad, se pueden corregir mediante el uso complementario de métodos de segunda generación, esto es conocido como ensamblaje genómico híbrido^[6]. Por lo tanto, actualmente las plataformas de

3.^a generación no pueden sustituir a las previas y resulta esencial la coexistencia de diferentes tecnologías de secuenciación para diferentes usos.

Secuenciación a tiempo real de una sola molécula (SMRT, PacBio)

Esta técnica fue desarrollada durante la primera década del siglo XXI por la empresa *Pacific Biosciences* (PacBio) la cual lanzó al mercado su primer secuenciador en 2011^[7]. El sistema de secuenciación a tiempo real de una sola molécula (SMRT, siglas en inglés) usa células de flujo que se basan en la tecnología «guía de onda de modo cero» (ZMW), que es un dispositivo que focaliza toda la luz hacia un punto para su detección. Esto permite registrar la señal lumínica emitida por un fluoróforo unido a un único nucleótido. En el fondo de cada ZMW se inmoviliza una molécula de ADN polimerasa que realiza la síntesis de la hebra complementaria de la molécula de ADN que se quiere secuenciar (Figura 1A y B). Esta ADN polimerasa está modificada para admitir nucleótidos hexafosfato que presentan un fluoróforo (específico para cada base nitrogenada) unido al último grupo fosfato^[8]. Al introducirse un nucleótido durante la fase de síntesis se libera su fluoróforo emitiendo fluorescencia durante un intervalo de tiempo determinado (Figura 1C). La señal lumínica emitida es detectada e interpretada como la incorporación de un nucleótido específico dependiendo de la longitud de onda de emisión del fluoróforo^[9]. De este modo, el proceso no requiere de ciclos de incorporación, sino que se realiza en continuo (a tiempo real) y permite la obtención de lecturas medias de unas 30 kb^[10]. Los tamaños de secuenciación son dependientes de la vida media de las polimerasas ancladas al fondo de los micropocillos. Por otra parte, el sistema SMRT da la posibilidad de secuenciar una muestra de ácidos nucleicos sin necesidad de amplificarla como ocurría en las tecnologías de 2.^a generación, en las que los sistemas de detección necesitaban una «masa crítica» de moléculas clonales que se secuenciasen al mismo tiempo^[3]. Una de las características de este tipo de metodología es la capacidad de secuenciar las dos hebras de un fragmento de ADN bicatenario gracias a adaptadores monohebra que forman bucles de horquilla (*SMRTbell template*) y unen ambas hebras del ADN molde. Uno de ellos une un cebador para la ADN polimerasa que así puede comenzar la síntesis/secuenciación y, tras sintetizar la hebra complementaria a una de las hebras del ADN molde, la polimerasa puede continuar sobre el otro adaptador del *SMRTbell template* y finalmente realizar la síntesis de la hebra complementaria de la segunda

hebra del ADN molde^[9]. Esto permite generar una secuencia consenso que aumenta la fidelidad de la secuenciación (Figura 1B). En el caso de tratarse de una secuenciación de ARN, en el sistema SMRT la ADN polimerasa es sustituida por una reversotranscriptasa, lo que permite obtener la secuencia del ARN

de la muestra pero sin tratarse de una secuenciación directa de ARN debido a la reversotranscripción^[11]. Teóricamente, esto permite analizar los transcritos completos (*full length*) de los ARN mensajeros y con ello la detección y cuantificación de las variantes de ajuste alternativo (*alternative splicing*).

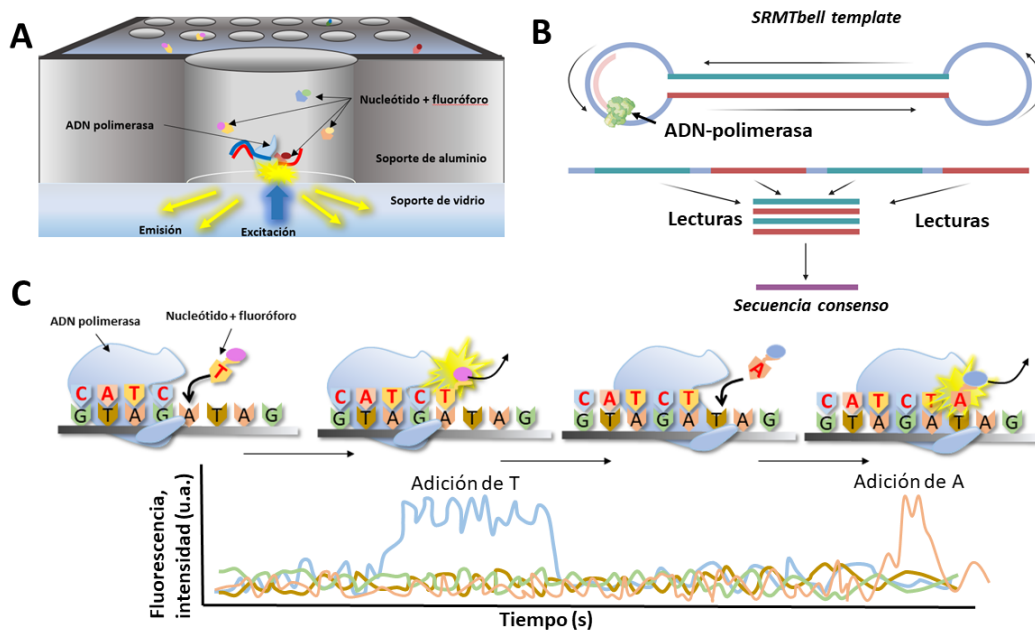


Figura 1. Representación esquemática de la tecnología de secuenciación SMRT de PacBio. A) ZMW contenido en una celda SMRT, en cuya parte inferior se encuentra una polimerasa inmovilizada. La unión del adaptador a la proteína anclada permite la síntesis de la hebra complementaria del ADN. La incorporación de un nucleótido marcado produce una liberación de fluorescencia que es detectada como la incorporación de un nucleótido específico atendiendo a la longitud de onda emitida. B) Proceso de síntesis de la hebra complementaria de ADN. Los adaptadores (lila) se encuentran ligados a los extremos de una doble cadena de ADN (azul y rojo) formando una estructura circular. La ADN polimerasa es la enzima encargada de llevar a cabo la síntesis de ADN. Posteriormente se obtienen un conjunto de fragmentos sintetizados (lecturas) que dan lugar a la obtención de una secuencia consenso. C) Cada nucleótido se encuentra marcado con un fluoróforo diferente. Cuando la ADN polimerasa incorpora un nucleótido marcado, se produce un pulso de fluorescencia que es detectado específicamente permitiendo la decodificación de la secuencia de ADN. El panel B fue diseñado con Biorender.

Una de las ventajas adicionales de la secuenciación *SMRT* es que se pueden determinar directamente modificaciones químicas de las bases nitrogenadas de los nucleótidos. En las técnicas de 2.^a generación se secuencian copias de la molécula de ADN o ARN original, lo que elimina las modificaciones químicas (marca epigenética) de los nucleótidos^[3]. Por lo tanto, requieren procedimientos previos a la secuenciación para marcar los nucleótidos que presentan una determinada modificación química (por ejemplo, secuenciación por bisulfito para determinación de metilaciones en las citosinas^[12]). Sin embargo, en el caso de las

tecnologías de 3.^a generación es posible detectar la presencia de cualquier nucleótido modificado (casi cualquier modificación) en la secuencia sin necesidad de marcajes previos. La detección de los nucleótidos modificados se produce debido a que existe un retraso por parte de la ADN polimerasa en la introducción de los nucleótidos cuando se encuentra un nucleótido modificado^[13] (Figura 2). Además, esta capacidad también permite la detección de marcas epitranscriptómicas en el ARN utilizando el mismo principio^[11].

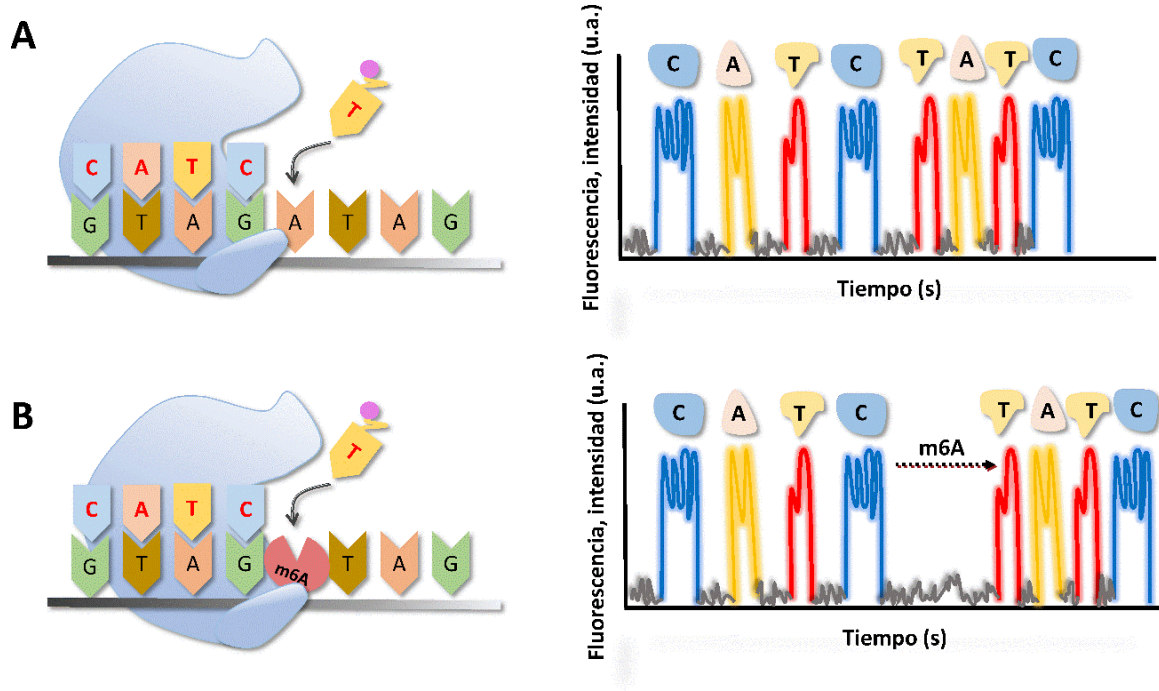


Figura 2. Detección de la modificación química del ADN N⁶-metiladenosina (m⁶A). Comparación esquemática del proceso de síntesis de ADN por la polimerasa en ausencia (A) y presencia (B) de m⁶A. Cuando la ADN polimerasa encuentra en la secuencia molde una modificación química, se produce un retardo en el tiempo de incorporación del nucleótido lo que se traduce en una diferencia temporal en la detección del pulso de fluorescencia, indicando la presencia de m⁶A.

Tecnología Oxford Nanopore (ONT)

De manera posterior a la aparición de la secuenciación SMRT de PacBio surge como alternativa *Oxford Nanopore Technology* (ONT). Esta empresa ha desarrollado su tecnología durante las dos primeras décadas del siglo XXI, incluso se puede considerar que todavía se encuentra en desarrollo. En abril de 2014, el MinION, un equipo de secuenciación miniaturizado y portátil que tiene un tamaño ligeramente mayor que el de una memoria USB, fue distribuido a más de 1.000 laboratorios para realizar pruebas beta a través del Programa de Acceso MinION (MAP). Un año después, comenzó su comercialización. Desde 2015 han aparecido dispositivos con diferentes capacidades incluso algunos que permiten la secuenciación sin la asistencia de un ordenador adicional para hacer secuenciación en el terreno^[13].

Se trata de una tecnología de secuenciación totalmente diferente al resto de las presentadas y, a diferencia de ellas, no se basa en la complementariedad de los ácidos nucleicos. Su principio técnico se basa en los estudios iniciados por David Deamer durante la década de los 90. Se aprovecha de los perfiles de corriente eléctrica que genera cada molécula (en este caso nucleótidos) al pasar a través de un poro en

una membrana a cuyos lados hay establecido un diferencial de voltaje^[15,16]. De esta manera, es posible determinar la secuencia de una hebra de ácidos nucleicos de manera directa, sea ADN o ARN, algo que ni en el caso de la SMRT es posible puesto que realiza una reversotranscripción al secuenciar ARN. En el lado de entrada de las moléculas se establece una carga negativa y al otro extremo una carga positiva para facilitar el movimiento de los ácidos nucleicos. En el lado de la detección se incluye un electrodo y un circuito integrado (ASIC) (Figura 3A) para detectar la corriente eléctrica generada como consecuencia del paso de cada nucleótido a través de un poro y así registrar los datos en un nuevo formato de archivo de secuenciación FAST5 (los formatos generalmente obtenidos en secuenciación son los FASTQ). Estos archivos contienen la información bruta de los datos de corriente eléctrica de cada poro de la membrana que es traducido a nucleótidos cuando se realiza el proceso de *basecalling*^[10]. Los poros incrustados en la membrana están formados por proteínas como la lipoproteína CsgG de *Escherichia coli* con modificaciones que permiten el paso específico a través de ella de ácidos nucleicos (Figura 3B)^[17]. Además, los ácidos nucleicos a secuenciar deben unirse previamente a adaptadores de ADN unidos a una proteína motora, como la helicasa, que se unen al poro y promueven el paso de la hebra del ácido nucleico a través de és-

te^[16] (Figura 3C). Gracias a ello, es posible generar lecturas de hasta 2,3 Mb^[10], tamaño superior que el de algunos genomas bacterianos.

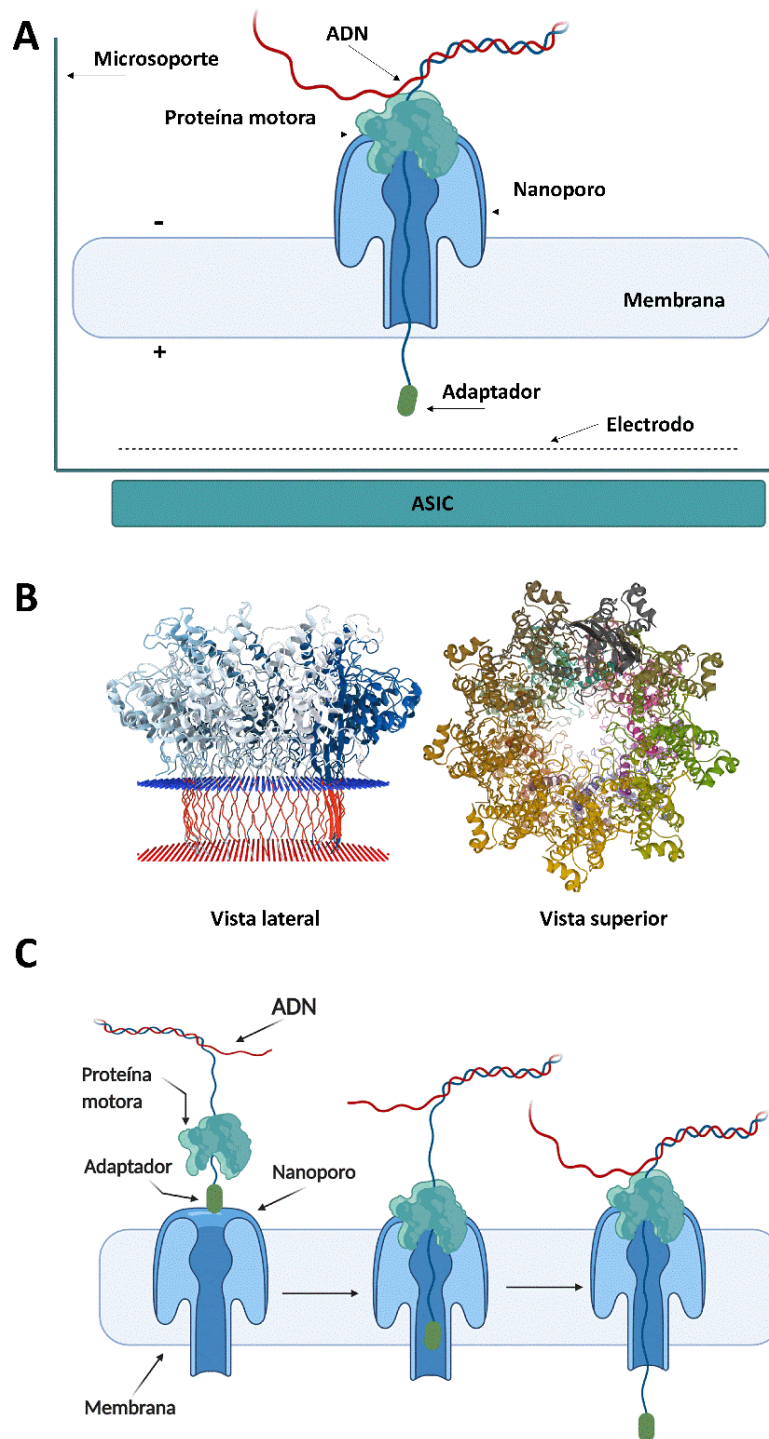


Figura 3. Representación de los principales componentes de la secuenciación de Oxford Nanopore. A) Ilustración esquemática de los componentes del soporte de secuenciación de la tecnología de Oxford Nanopore (ONT). B) Estructura de la proteína CsgG de *Escherichia coli*, una variante del poro proteico utilizado en el soporte MinION, PDB ID: 4UV3. C) Representación del complejo de secuenciación de ácidos nucleicos de la tecnología de Oxford Nanopore (ONT). Las figuras A y C fueron creadas usando Biorender.

En teoría, una de las ventajas de esta técnica sería que permitiría identificar cualquier molécula que atravesase el poro, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos^[17]. Por el momento, se usa solamente para la secuenciación de ácidos nucleicos, ADN y ARN. Esto convierte a ONT en la única plataforma de secuenciación distribuida en la actualidad que realiza la secuenciación directa de ARN sin necesidad de realizar una reversotranscripción. Además, como ocurre con la secuenciación SMRT de PacBio, al ser posible secuenciar directamente una muestra sin necesidad de realizar un proceso de amplificación, la tecnología ONT permite que en los análisis de RNA-Seq se necesiten menos lecturas para obtener un análisis estadístico robusto de las muestras^[18], puesto que se evitan los sesgos derivados de los pasos de reversotranscripción y amplificación. La capacidad de detección de la huella eléctrica de cualquier ácido nucleico permite además la identificación de bases nitrogenadas con modificaciones químicas, pues éstas implican cambios en la corriente generada por la molécula al atravesar el poro con respecto al cambio que originaría el nucleótido en cuestión sin modificaciones químicas. Al igual que ocurre con el sistema SMRT de PacBio, estas características hacen idónea esta plataforma para su empleo en campos como la epigenómica, así como para la epitranscriptómica (estas marcas también se pueden detectar en el ARN^[19]).

Como se ha mencionado en la descripción de esta técnica, un aspecto muy relevante es la longitud de las lecturas, actualmente las mayores de todas las plataformas de secuenciación. Además de en la Genómica estructural y del análisis de transcriptomas, esto tiene mucha relevancia en cuanto a los estudios metagenómicos, aquellos en los que se analiza el ADN/ARN de todos los organismos de una muestra biológica, suelo, medio marino, entre otros (generalmente microorganismos). Los tamaños de las lecturas hacen posible que la identificación de los organismos sea más precisa. Por norma general, las lecturas obtenidas en estos análisis se analizan frente a bases de datos de ácidos nucleicos, como las contenidas en GenBank, utilizando herramientas tipo BLAST^[20] (*Basic Local Alignment Search Tool*, que realiza alineamientos de secuencias de ácidos nucleicos frente a bases de datos de ácidos nucleicos conocidos). La ventaja de tener grandes tamaños de lecturas es que permiten comparaciones más ajustadas con las secuencias de los organismos en las bases de datos. Esto se pudo comprobar en el seminario Málaga Nanopore celebrado en la Universidad de Málaga el 25 de abril de 2019^[21], donde se presentó el trabajo de la empresa Xenogen. Su trabajo con esta tecnología demuestra que es muy superior para la identificación de microorganismos en

estudios de metagenómica. Incluso puede ayudar en el caso del diagnóstico microbiológico de humanos en circunstancias en las que las técnicas de diagnóstico clásicas quedan rebasadas.

En contrapartida, también resulta importante hablar de los inconvenientes o factores limitantes que presenta esta técnica. La principal limitación es el desarrollo del software propio de análisis de los archivos de lecturas FAST5, que hasta el momento presenta una alta tasa de error. Sin embargo, gracias al continuo desarrollo de software de interpretación de datos se está consiguiendo aumentar de fiabilidad de los resultados obtenidos. Paralelamente a este inconveniente está el problema del almacenamiento de datos. De cada secuenciación se puede obtener más de 200 Gb de datos crudos, necesitando sistemas con un gran volumen de almacenaje y transferencia de datos. Por último, hay que tener en cuenta la naturaleza biológica (proteínas) de los nanoporos en los que se lleva a cabo la secuenciación, esto hace que las células de flujo que contienen los nanoporos tengan una vida media limitada. Todo ello marca la necesidad de una correcta organización para utilizar con éxito esta tecnología.

Conclusión

Desde las primeras aproximaciones de Frederick Sanger en los años 60 hasta la actualidad, los métodos de secuenciación de ácidos nucleicos han transformado las Ciencias Biológicas, dando lugar a que la Biología Molecular se encuentre presente en múltiples campos y abriendo el camino al desarrollo de nuevas disciplinas como la Genómica que comienza a ser ampliamente utilizada en el campo de la Medicina, Microbiología o Ciencias Ambientales, entre otros ejemplos. Estamos cerca de que estas técnicas nos permitan a un coste asequible la secuenciación del genoma de cualquier persona para su diagnóstico o para intentar implementar un tratamiento personalizado frente a las enfermedades. Gracias al desarrollo último de estas técnicas se ha podido secuenciar el virus SARS-CoV-2 en menos de un mes desde su detección^[22], incluso realizar estudios sobre su propagación y analizar los diferentes subtipos o cepas que han aparecido. En retrospectiva, esto es algo increíble ya que el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se aisló por primera vez en 1983^[23] y hasta el año 1985^[24] no se pudo secuenciar su genoma completo. Actualmente, se están intentando mejorar las técnicas de secuenciación y realizar nuevas aproximaciones que soslayan los problemas más frecuentes, como ensayar el uso de nanoporos compuestos de materiales robustos como el grafeno para sustituir

a las proteínas^[25]. Cabe recalcar el hecho de que el avance y desarrollo de estas tecnologías no solo pasan por la mejora y subsanación de sus debilidades. La empresa de Oxford Nanopore Technology se encuentra en el desarrollo de un mecanismo que permita, además de la secuenciación de ácidos nucleicos, la secuenciación y análisis de proteínas utilizando las mismas plataformas físicas existentes^[26,26], lo que podría ayudar al incremento en la eficiencia y rapidez de procesos como la identificación y validación de nuevas proteínas, pasos clave en la detección de biomarcadores de enfermedades. Partiendo de una tecnología diseñada para el estudio de los ácidos nucleicos se podrían revolucionar las Ciencias Biológicas transformando completamente disciplinas como la Proteómica y sustituyendo sistemas indirectos de identificación y cuantificación de proteínas como la espectrometría de masas. Probablemente, dentro de poco tiempo haya que añadir un nuevo capítulo a la historia de los métodos de secuenciación sin incluir «de ácidos nucleicos».

Referencias

- [1] NIH, Coste de la secuenciación de un genoma humano. <https://www.genome.gov>.
- [2] De la Torre y otros. Insights into Conifer Giga-Genomes. *Plant Physiology* 166: 1724-1732, 2014.
- [3] Valderrama Martín y otros. Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Segunda generación. Encuentros en la Biología 174: vol 13, verano 2020.
- [4] Wenger y otros. Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nature Biotechnology* 37: 1155-1162, 2019.
- [5] Jain y otros. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology* 36: 338-345, 2018.
- [6] Sohn y Nam. The present and future of de novo whole-genome assembly. *Brief Bioinformatics* 19: 23-40, 2018.
- [7] GenomeWeb. <https://www.genomeweb.com>.
- [8] Ermert y otros. Phosphate-Modified Nucleotides for Monitoring Enzyme Activity. *Topics in Current Chemistry* (Cham) 375: 28, 2017.
- [9] Rhoads y Au. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13: 278-289, 2015.
- [10] Amarasinghe y otros. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biology* 21: 30, 2020.
- [11] Vilfan y otros. Analysis of RNA base modification and structural rearrangement by single-molecule real-time detection of reverse transcription. *Journal of Nanobiotechnology* 11: 8, 2013.
- [12] Wreczycka y otros. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. *Journal of Biotechnology* 261: 105-115, 2017.
- [13] Flusberg y otros. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature Methods* 7: 461, 2010.
- [14] Oxford Nanopore history. <https://nanoporetech.com>.
- [15] Clarke J y otros. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotech.* 4: 265-270, 2009.
- [16] Feng y otros. Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 13: 4-16, 2015.
- [17] Oxford Nanopore. Nanopore sensing - how it Works. <https://nanoporetech.com/how-it-works>.
- [18] Byrne y otros. Nanopore long-read RNAseq reveals widespread transcriptional variation among the surface receptors of individual B cells. *Nature Communications* 8: 16027, 2017.
- [19] Garalde DR y otros. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nature Methods*, 15: 201, 2018.
- [20] Altschul, S.F. y otros. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990.
- [21] Málaga Nanopore, noticia. <https://www.aulamagna.com.es>.
- [22] Zhou y otros. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270-273, 2020.
- [23] Barré-Sinoussi y otros. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871, 1983.
- [24] Ratner y otros. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313: 277-284, 1985.
- [25] Mojtavavi y otros. Single-Molecule Sensing Using Nanopores in Two-Dimensional Transition Metal Carbide (MXene) Membranes. *ACS Nano* 13: 3042-3053, 2019.
- [26] Oxford Nanopore Protein Analysis. <https://nanoporetech.com/applications>.
- [27] Nanopore-based 5D fingerprinting of single proteins in real-time (London Calling Presentation). <https://nanoporetech.com>.

CUARENTA AÑOS DE LA CREACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA EN LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (1980-2020)

por FRANCISCO M. CÁNOVAS RAMOS

CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

CANOVAS@UMA.ES

Breve recorrido a través de la historia del Departamento de Bioquímica, más tarde denominado Bioquímica, Biología Molecular y Química Orgánica, y actualmente Biología Molecular y Bioquímica. Para resumir, en adelante haré referencia siempre a su primera denominación que se pretende conmemorar en este artículo.

En enero de 1980 me incorporé al Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y a la recién estrenada titulación de Ciencias Biológicas de la Universidad de Málaga (UMA), si bien tengo que decir que años atrás ya se impartían clases de la titulación de Biología hasta tercer curso, en el marco del Colegio Universitario dependiente de la Universidad de Granada. Por entonces no existía el Departamento de Bioquímica, y la docencia de esta materia estaba bajo la tutela del Departamento de Morfología que dirigía el catedrático Fernando Marín. El único profesor que además de dar clase realizaba investigación en el Laboratorio de Bioquímica era el Dr. Jesús Sánchez-Olavarría, junto a Francisca Sánchez-Jiménez (Kika) que se había incorporado unos meses antes como becaria. En ese año conseguí una beca del Instituto Nacional de Promoción del Estudiante (INAPE) para realizar la tesis doctoral sobre la enzimología del metabolismo del carbono y nitrógeno en el tumor ascítico de Ehrlich. En septiembre de 1980, el Profesor Jacobo Cárdenas se incorporó a nuestra Universidad como Profesor Agregado «numerario» de Bioquímica y Biología Molecular, procedente de la Universidad de Sevilla. Por aquella época, la mayoría (más del noventa por ciento) de los profesores de la Facultad de Ciencias eran «no numerarios» (PNN), es decir carecían de plaza en propiedad y la ocupaban de forma interina. Jacobo Cárdenas unificó la enseñanza de la Bioquímica en las licenciaturas de Biología y Química de la Facultad de Ciencias y creó el Departamento de Bioquímica convirtiéndose en su primer Director. Él mismo impartió las asignaturas de Bioquímica en la titulación de Química mientras que Jesús Sánchez Olavarría siguió impartiendo Bioquímica en Biología. En el presente año de la pandemia, 2020, se cumplen pues cuarenta años del nacimiento de nuestro Departamento. En el mes de octubre de 1980 conseguí acceder a una plaza de Profesor Ayudante de la mano del Profesor Cárdenas, quién poco después me ofreció cambiar de tema de tesis doctoral para investigar el metabolismo del nitrógeno de orga-

nismos fotosintéticos. Ni que decir tiene que acepté su ofrecimiento de forma inmediata y desde entonces he mantenido esta línea de trabajo hasta nuestros días. Quiero reconocer de forma muy especial la labor de los profesores Sánchez-Olavarría y Cárdenas, que tanto influyeron en la fundación del Departamento de Bioquímica de la UMA, y en el inicio de la carrera profesional de los que por aquel entonces eran jóvenes doctorandos. Desafortunadamente, muy pronto nos dejaron huérfanos de su magisterio al fallecer ambos de forma prematura. A aquéllos que no conocieron la descomunal talla científica y humana del profesor Cárdenas les recomiendo la lectura del libro que en su homenaje editó uno de sus discípulos, el profesor Emilio Fernández Reyes y que publicó la Universidad de Córdoba en 1999. A continuación transcribo parte del texto que escribió Kika en esa publicación:

«Cuando yo tenía 22 años Jacobo me enseñó cómo, a partir de 80 metros cuadrados de solería y tres mesas de laboratorio de mala calidad, se puede crear un Departamento de Bioquímica. Fue una gran lección en un momento en el que yo necesitaba mucho valor para encarar mi propio futuro. Él sólo contaba con sus fuerzas y tres jovencitos que le ayudábamos en lo que podíamos. El que más le ayudó de los tres también se ha ido para siempre.»

Esta última frase hacía referencia a Jesús Sánchez-Olavarría.

En el curso 81-82 Jacobo Cárdenas accedió a la cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba donde permaneció hasta su fallecimiento en 1996. En su lugar llegó a la Universidad de Málaga el profesor Ignacio Núñez de Castro y poco después se incorporó también Victoriano Valpuesta. Durante los primeros años de andadura del

Departamento las materias impartidas estaban relacionadas con la Bioquímica general, la Enzimología y la Regulación Metabólica. A partir del curso 1989-90 se oferta por primera vez la asignatura de Biología Molecular, una disciplina que ha experimentado un crecimiento vertiginoso en las últimas dos décadas del siglo XX y que permitió el nacimiento de un nuevo campo científico, la genómica, cuyo punto de referencia es sin duda alguna, la culminación del proyecto de secuenciación del genoma humano en el año 2003. De hecho, los avances recientes en la comprensión de los sistemas biológicos están basados en gran medida en la mejora de los métodos de secuenciación de DNA y el desarrollo de la genómica.

Desde su creación hasta la actualidad, el Departamento ha crecido de forma exponencial en el número de profesores pasando de los cinco iniciales a los 27 de la actualidad. La labor docente realizada por los profesores de Bioquímica también ha crecido de forma paralela y hemos pasado de impartir asignaturas en dos titulaciones al principio, a siete en el presente, a las que habría que añadir las enseñanzas de máster y doctorado, que hace cuarenta años eran inexistentes como programas oficiales de posgrado adscritos a nuestro Departamento. En este sentido, hay que señalar que el programa en Biología Celular y Molecular, coordinado entonces y también ahora por nuestro Departamento, se seleccionó como programa de Doctorado de Calidad por el Ministerio de Educación y Ciencia en 1994. Desde entonces ha sido reconocido como tal y recibió la «Mención hacia la Excelencia» en la última evaluación realizada (BOE 20 de octubre de 2011). Especialmente reseñable también en el ámbito de la docencia es la implantación del grado de Bioquímica en el año 2012, una titulación conjunta de las Universidades de Málaga y Sevilla en el marco de las actividades del Campus de Excelencia internacional Andalucía Tech. Muchos de nuestros alumnos egresados de la UMA han orientado su carrera profesional hacia el ámbito de la Bioquímica y Biología molecular, y desempeñan su labor como profesores universitarios e investigadores en diferentes destinos de España y el extranjero.

Además de esta formidable labor docente, el Departamento de Bioquímica se ha caracterizado desde su comienzos por una intensa y muy productiva labor investigadora. El Premio Nobel y Doctor Honoris Causa por la UMA, el Profesor Severo Ochoa, se refería a la investigación en la Universidad con las siguientes palabras:

«La Universidad debe jugar un papel fundamental en la investigación, ya que una función primordial de la misma es la de formar a los futuros investigadores. ¿Y cómo puede desempeñar este papel una Universidad que no investiga?»

En mi opinión, para conseguir una enseñanza de calidad en la Universidad es necesario realizar una investigación de excelencia. Si no es así, los profesores universitarios nos convertiríamos en meros transmisores del conocimiento generado por otros. De hecho, las mejores universidades del mundo fundamentan su calidad en la excelencia de sus grupos de investigación y de las contribuciones científicas que realizan para el avance del conocimiento humano. Son muchas las publicaciones realizadas por el Departamento de Bioquímica de la UMA, tanto en solitario como en colaboración con otros centros prestigiosos del mundo. De acuerdo con la base de datos *ResearchGate* serían alrededor de 800 los trabajos en los que figura algún miembro de nuestro Departamento. Evidentemente no es posible recogerlos todos en este breve recorrido histórico, solo haré referencia a 3 de ellos llevados a cabo en nuestros laboratorios y que corresponden a épocas bien distintas, justificando los motivos de mi elección:

1. Olavarría JS, Sánchez F, Cánovas FM, Núñez de Castro I. Influencia del amonio en el efecto Crabtree en dos cepas de tumor ascítico de Ehrlich (1982). *Revista Española de Fisiología*, 38, 165-168.

Esta modesta publicación fue la primera realizada por miembros del Departamento de Bioquímica de la UMA, tan solo dos años más tarde de la creación del Departamento. Los resultados que contiene se consiguieron sin financiación externa alguna.

2. Cantón FR, García-Gutiérrez A, Gallardo F, de Vicente A, Cánovas FM. Molecular characterization of a cDNA clone encoding glutamine synthetase from a gymnosperm: *Pinus sylvestris* (1993) *Plant Molecular Biology* 22, 819-828.

Es la primera publicación de la UMA en la que se describe la clonación molecular de un gen, la determinación de su secuencia de nucleótidos y estudios de expresión génica. Los resultados pertenecen a la primera Tesis Doctoral de Biología Molecular presentada en la UMA.

3. Agius F*, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V.

(2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* 21,177-81.

En esta publicación se describe como aumentar el contenido en vitamina C en plantas. El trabajo ilustra cómo la biotecnología de plantas puede mejorar la producción de un componente esencial en la nutrición humana. *La primera autora de este trabajo, una joven estudiante de doctorado en nuestro Departamento, falleció pocos años después de la publicación de este trabajo pero sigue muy presente en la memoria de los que tuvimos la suerte de conocerla.

Otro aspecto particularmente importante que no hay que olvidar ha sido el liderazgo y la participación activa de varios grupos de investigación del Departamento de Bioquímica en la dotación de la infraestructura científica de diferentes centros de la UMA, entre los que cabe mencionar:

- Los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI).
- El Centro de Bioinnovación situado en el Parque Tecnológico de Andalucía (PTA).

- El Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora» (IHSM).
- El Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

Finalmente, quiero reconocer la labor entusiasta de todas las personas que movidas por su vocación hacia la bioquímica trabajan o han trabajado en nuestro Departamento. Mis últimas palabras se dirigen, de forma muy especial, a los más jóvenes que en estos momentos inician su carrera investigadora en nuestros laboratorios:

«El futuro de la bioquímica está en vuestras manos, que la pasión por descubrir guíe vuestro tránsito por caminos inexplorados y que al final, cuando volváis la vista atrás lo hagáis con satisfacción.»

Francisco M. Cánovas.
Yo también fui becario.



Jesús Sánchez Olavarría



Jacobo Cárdenas Torres

LA DIETA MEDITERRÁNEA

por [†]INÉS BRAVO RUÍZ Y [‡]ELENA VERDUGO TORRES[†]4.º GRADO EN BIOQUÍMICA, [‡]3.º GRADO EN BIOLOGÍA

INESBRAVORUIZ@HOTMAIL.COM,AUSTRALOPITHECUS_73@HOTMAIL.COM

La dieta mediterránea se correlaciona con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes tipo 2, Alzheimer, entre otros. Estos efectos positivos en la salud pueden explicarse por la sinergia de compuestos bioactivos, vitaminas y ácidos grasos insaturados, presentes en distintos alimentos de la dieta. La mayoría de estos compuestos tienen acción antioxidante e intervienen en rutas de inflamación y de proliferación celular, de donde se deduce su función en la prevención de enfermedades. No obstante, los beneficios asociados a la dieta mediterránea no solo se deben al patrón dietético, sino también a otras costumbres saludables propias de la región mediterránea, como el ejercicio físico.

The Mediterranean diet correlates with a lower risk of suffering from cardiovascular disease, cancer, type 2 diabetes, Alzheimer, among others. These positive effects in health account for a synergy of bioactive agents, vitamins and unsaturated fatty acids, present in different foods in the diet. Most of these compounds have antioxidant action and are implicated in routes of inflammation and cell proliferation, from which its role in disease prevention is deduced. However, the benefits associated with the Mediterranean diet are not only due to the dietary pattern, but also to other healthy practices typical of the Mediterranean region, such as physical exercise.

Dieta mediterránea, compuestos bioactivos, fenoles, hidroxitirosol, terpenoides, ácidos grasos omega 3, antioxidante, antiinflamatorio, cáncer.



¿Por qué es tan beneficiosa?

Por las mañanas una cucharada de aceite de oliva,

¡que para todo ayuda!

No caer en la tentación del azúcar y la harina,

¡y disfrutar de la fruta madura!

A la hora de comer, elegir el pescado ante la carne roja,

¡y verdura en caso de duda!

Beber siempre agua y un vasito de vino sin que sea paradoja,

¡Cuerpo sano y mente aguda!

Poema de Inés Bravo Ruíz.



La dieta mediterránea, ¿quién no ha escuchado hablar de ella? El concepto general de en qué consiste está bien establecido en la población, sobre todo para aquella afortunada parte que, bañados por el Mediterráneo, disfrutamos de unas buenas tostadas con aceite de oliva y tomate para desayunar, de una dorada al horno para almorzar y de una rica ensalada con queso, atún, nueces y un poquito más de aceite para cenar. Si se nos hace la boca agua al leer esto, será que estamos de acuerdo en el sabor tan autén-

tico de estos platos. Pero no es ésta la razón por la que se ha hecho popular internacionalmente; si no, pregunten a los estadounidenses lo sabrosa que está su hamburguesa, a los chinos por los rollitos de primavera o a los alemanes por su *currywurst*. La fama de la dieta mediterránea recae no solo en su sabor, sino precisamente en los beneficios que aporta frente a otras dietas basadas en alimentos ultraprocesados.

Entre sus muchos beneficios, la dieta mediterránea contribuye a la prevención de enfermedades car-

diovasculares y obesidad, combate la oxidación y el envejecimiento celular prematuro, teniendo un efecto protector frente a enfermedades neurológicas como el Alzheimer o la depresión e incluso, un papel preventivo relevante en ciertos tipos de cánceres. En base a la evidencia de los efectos positivos de esta dieta, surge la pregunta: *¿qué es lo que hace que sea tan saludable?*

El patrón dietético mediterráneo se basa en una ingesta rica en frutas y verduras, cereales, legumbres, frutos secos, aceite de oliva, una ingesta baja de carnes rojas (sustituidas preferiblemente por las carnes blancas de bajo contenido en grasa y pescado) y un consumo habitual pero moderado de vino. Entre todos estos alimentos, el aceite de oliva virgen extra, empleado para cocinar alimentos, aderezar ensaladas y hasta en las tostadas, tiene un papel destacable. No obstante, los beneficios de la dieta mediterránea parecen asociarse más bien con una sinergia entre varias moléculas, con propiedades particulares, presentes en los alimentos más representativos de esta dieta.

Estas moléculas, conocidas como agentes bioactivos, son minoritarias pero de carácter beneficioso por sus funciones vinculadas a la prevención de diversas enfermedades. Dichos compuestos bioactivos, también denominados fitoquímicos por tener un origen vegetal, son principalmente de naturaleza fenólica o terpenoide. En esta sección, nos centraremos en algunos de ellos: el hidroxitirosol, como fenol simple; el resveratrol como ejemplo distintivo de los polifenoles, junto a los flavonoides; y el licopeno, del grupo de los terpenoides. También mencionaremos a otras moléculas presentes en la dieta mediterránea que, no siendo considerados estrictamente agentes bioactivos, contribuyen especialmente al mantenimiento de la salud, como son los ácidos grasos insaturados esenciales, el óxido nítrico o algunas vitaminas, como la E y C.

Compuestos y alimentos beneficiosos de la dieta mediterránea

Los ácidos grasos insaturados son conocidos por poseer dobles enlaces o insaturaciones en su cadena carbonada, distinguiendo monoinsaturados y poliinsaturados. Su consumo es preferible al de los ácidos grasos saturados, puesto que aportan flexibilidad a las membranas plasmáticas, siendo parte constituyente de ellas, además de tener una función señalizadora y en regulación de la expresión génica fundamental para el correcto funcionamiento del organismo.

Dentro de este grupo, destaca el aceite de oliva, alimento básico de la dieta mediterránea. En el aceite

de oliva, se distinguen dos fracciones: una representa hasta el 98-99% del peso total de éste, la fracción saponificable, que se corresponde con triglicéridos, ácidos grasos monoinsaturados (en particular el oleico) y fosfolípidos. La otra fracción no saponificable incluye compuestos fenólicos, triterpenoides, esteroides y compuestos alifáticos, a los que se le atribuyen la mayoría de los beneficios del aceite de oliva.

El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado perteneciente a la familia omega 9 por poseer el doble enlace en el carbono cis número 9. Aparte de la familia omega 9, los ácidos omega-3/-6 son conocidos por desempeñar funciones cruciales y antagónicas en el organismo. La biosíntesis en el ser humano de estos ácidos grasos es limitada (de ahí que se consideren esenciales), por lo que sus efectos son notables con una ingesta de alimentos donde abundan. Los ácidos omega-6 provienen principalmente de carnes y de algunos frutos secos y cereales, los ácidos omega-3 se obtienen en cantidades considerables de semillas y aceites, y del pescado, que lo incorpora a su vez de las algas o del plancton como fuente primaria. En esta sección, dedicaremos especial atención a los ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-3: el α -linolénico y sus derivados, ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico, ya que parecen ser responsables de bastantes beneficios de la dieta mediterránea^[1,2].

El siguiente grupo de moléculas beneficiosas de la dieta mediterránea son los compuestos fenólicos. Los polifenoles y compuestos fenólicos simples son sustancias químicas que presentan al menos un grupo fenol en su composición. Entre ellos, destaca el hidroxitirosol, que es un compuesto fenólico simple con propiedades antioxidantes, tanto en su forma libre como en su forma de glucósido secoiridoide (un grupo de monoterpenos) esterificado, la oleuropeína. El hidroxitirosol es uno de los fenoles más importantes del aceite de oliva, mientras que el resveratrol, un polifenol, lo es del vino tinto. Aunque estas moléculas no destacan por ser un componente abundante, tienen un valor para la salud de gran importancia.

Por otra parte, las frutas y verduras proveen un rango de nutrientes y compuestos bioactivos muy amplio, de los cuales destacaremos los flavonoides y los terpenoides, junto a las vitaminas. La vitamina E o α -tocoferol es conocida por su acción antioxidante y se encuentra presente en el aceite de oliva, los frutos secos y los vegetales de hoja verde. Es una vitamina liposoluble que protege del estrés oxidativo, regula la función inmune y mantiene la integridad de las células endoteliales.

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble presente en frutas ácidas como la fresa, el kiwi, el mango o las grosellas. Su deficiencia causa

el escorbuto; es una importante coenzima y molécula antioxidante.

Finalmente, la última molécula a destacar es el óxido nítrico, que se obtiene a partir del metabolismo del aminoácido *L*-arginina, por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), en presencia de NADPH y oxígeno. Este aminoácido abunda en alimentos como la remolacha, las nueces, la sandía, las espinacas o la naranja.

Efectos positivos en la salud de la dieta mediterránea

Efecto vasodilatador y cardioprotector

La enfermedad cardiovascular es una de las más prevalentes en el mundo desarrollado actualmente. Esto va asociado con una mayor prescripción de fármacos hipotensores, que podrían imitar las propiedades vasodilatadores de ciertos nutrientes de la dieta mediterránea.

Un ejemplo es el óxido nítrico, descrito como «factor relajante del endotelio». Este gas, en el organismo, acciona un mecanismo de bajada de niveles de calcio, favoreciendo la relajación del músculo liso arteriolar. Ello supone un aumento de la luz de las arterias y menor riesgo de hipertensión.

Otro ejemplo de compuestos de acción vasodilatadora son los eicosanoides derivados de omega-3. Los fosfolípidos dispuestos en la membrana plasmática pueden ser hidrolizados por la fosfolipasa A2, liberando los ácidos grasos omega-3 y omega-6 de la posición 2, a partir de los cuales las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas desencadenan una cascada de señalización que concluye en la síntesis de eicosanoides: prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos (propios de plaquetas) y leucotrienos (propios de leucocitos). De gran importancia es el hecho de que existen distintas isoformas de estos eicosanoides con diferente función biológica, según el tipo de ácido poliinsaturado del que provengan. Así, mientras los tromboxanos procedentes del ácido araquidónico (omega-6) contribuyen a agregación plaquetaria y vasoconstricción, los procedentes de ácido eicosapentanoico (omega-3) son biológicamente inactivos. Por tanto, en la dieta mediterránea, donde el consumo de pescado es abundante en detrimento de las carnes rojas, los omega-3 aumentan su proporción, contrarrestando la acción vasoconstrictora de los omega-6.

Además, en esta ruta inciden muchos otros compuestos bioactivos. El hidroxitirosol y el resveratrol son inhibidores de las ciclooxigenasas (con un mecanismo similar al del ácido acetilsalicílico), de forma

que también tienen una acción antiplaquetaria y antiinflamatoria^[3,4,5].

Acción antioxidante

Muchas patologías están íntimamente relacionadas con el estrés oxidativo (enfermedad cardiovascular, Alzheimer, cáncer, envejecimiento celular, etc.)^[6], de forma que la ingesta de alimentos con moléculas antioxidantes propios de la dieta mediterránea es una de las explicaciones más evidentes de la diversidad de beneficios de la misma.

En cuanto a los antioxidantes, especial mención a la vitamina E o α -tocoferol, de gran importancia en el ciclo de peroxidación lipídica, donde los radicales libres oxidan a ácidos poliinsaturados de forma cíclica. La peroxidación lipídica es relevante en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

Asimismo, la diabetes y la aterosclerosis son otras patologías promovidas por el estrés oxidativo. Respecto a esta última, caracterizada por la formación de placas de ateroma que pueden desprenderse y generar trombos, se sabe que la oxidación de LDL es el factor aterogénico principal. En este punto intervienen muchos compuestos bioactivos, manifestando la transcendencia en el estado de salud que puede tener la combinación de estos compuestos, a partir de una dieta variada. Por ejemplo, mientras que los ácidos grasos insaturados antes nombrados reducen el nivel de la lipoproteína de baja densidad (LDL) circulante, algunos compuestos fenólicos con capacidad reductora impiden su oxidación. Entre estos, destacamos el hidroxitirosol, el resveratrol, la oleuropeína y el licopeno, carotenoide abundante en el tomate. El resultado sinérgico es una disminución de la colesterolemia y menor riesgo de complicaciones vasculares.

Poder antiinflamatorio

Junto al poder antioxidante, la función antiinflamatoria es una característica común a muchos de los nutrientes de la dieta mediterránea. Posibles mecanismos mediante los cuales se regula la inflamación son la ruta de eicosanoides y la inhibición del gen *NF κ B1*.

Por una parte, puesto que los leucotrienos (resultantes del metabolismo de los ácidos grasos esenciales) están implicados en quimiotaxis de células del sistema inmune e inflamación, los polifenoles nombrados que interfieren en esta ruta ejercen un papel antiinflamatorio, al igual que los ácidos grasos omega-3. Además, el ácido docosohexanoico también forma derivados

que participan en la resolución de la inflamación, conocidos como resolvinas. Este mecanismo podría explicar precisamente el papel protector de este ácido graso poliinsaturado en el cerebro, donde se produce un tipo de resolvina, neuroprotectina, que inhibe la apoptosis de las neuronas. Las resolvinas pueden afectar en numerosos procesos de inflamación, siendo importantes en la peritonitis, colitis e inflamación cutánea.

Por otra parte, se sabe que muchos compuestos bioactivos inhiben la síntesis de interleuquinas implicadas en la respuesta inflamatoria. El hidroxitirosol disminuye niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina 1 alfa (IL-1 α). El licopeno inhibe a TNF- α y estimula producción de IL-10. La quercetina es un polifenol flavonoide abundante en cebollas rojas, manzana y brócoli, que también inhibe TNF- α . El TNF- α , es un potente activador del gen *NFkB1*, factor de transcripción maestro que activa una gran variedad de genes proinflamatorios, controlando asimismo la proliferación y apoptosis.

Efecto anticancerígeno

Uno de los descubrimientos más recientes^[7,8] menciona que la oleuropeína y el hidroxitirosol (ambos comparten un anillo similar al estradiol, hormona sexual femenina) podrían estar implicados en la ruta PI3K-ERK-AKT de las células cancerosas^[9]. De hecho, hay estudios^[10,7] que proponen cómo estos compuestos fenólicos del aceite de oliva compiten antagónicamente por los receptores EGFR, relacionados con la señalización intracelular que promueve la proliferación y la supervivencia de las células del cáncer de mama a través del factor Ras-Raf y de las proteínas ERK, que serían inhibidas también. Además, la oleuropeína e hidroxitirosol inhiben al TNF- α por fosforilación. Este factor induce un ambiente oxidativo y a unas proteínas implicadas en la apoptosis, las caspasas-9.

También se ha recomendado^[10] el consumo de miel, pues sus componentes bioactivos están relacionados con la activación de la apoptosis por medio de las caspasas-3, disminuyendo los niveles de especies oxidantes y protegiendo a las células de la actividad de la fosfatasa alcalina. La miel, sobre todo, fortalece el sistema inmune por sus compuestos fenólicos, de igual forma que lo hacen el ajo, la cebolla y el romero.

Otras moléculas esenciales de las frutas y verduras son los flavonoides, que actúan inhibiendo la metástasis mediante la fosforilación de receptores del factor de crecimiento endotelial (EGFR)/ factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2), unos receptores muy activos durante la angiogénesis y diseminación del tumor. Junto a los alcaloides, regulan las quinasas dependientes de ciclina, proteínas que por fosforilación intervienen en las distintas fases del ciclo celular.

Uno de los flavonoides que podríamos destacar es la quercetina. Se ha comprobado que ésta es capaz de regular el metabolismo glucolítico así como podría intermediar en la ruta PI3K-AKT1-p53 (Figura 1) previniendo la aparición de un linfoma.

No olvidemos los aceites esenciales y las vitaminas, procedentes de las plantas aromáticas, de las verduras y de las frutas. Están contruidos a base de terpenoides, los cuales manifiestan su actividad anticancerígena activando señalizadores pro-apoptóticos en las células tumorales, estimulando a p53 (proteína protectora frente a la carcinogénesis) y deteniendo el ciclo celular en el punto de control G2/M. Las vitaminas y los omega-3 también inhiben EGFR/HER2 (frenando la proliferación de células cancerosas) y combaten las especies reactivas del oxígeno (ROS) por su efecto antioxidante y antiinflamatorio. Las vitaminas inducen la apoptosis al estimular las caspasas-3 y p53. Este factor, conocido como el guardián del genoma, activa BAX, proteína inhibidora de BCL2, cuya función es reprimir la apoptosis en condiciones normales. Este efecto de inhibir al inhibidor de apoptosis promueve la muerte celular de células cancerosas.

El terpenoide licopeno, por su parte, inhibe ERK1/2, GSK3A/B y la fosforilación de AKT, proteína clave en la señalización del ciclo celular, el crecimiento y la migración celular.

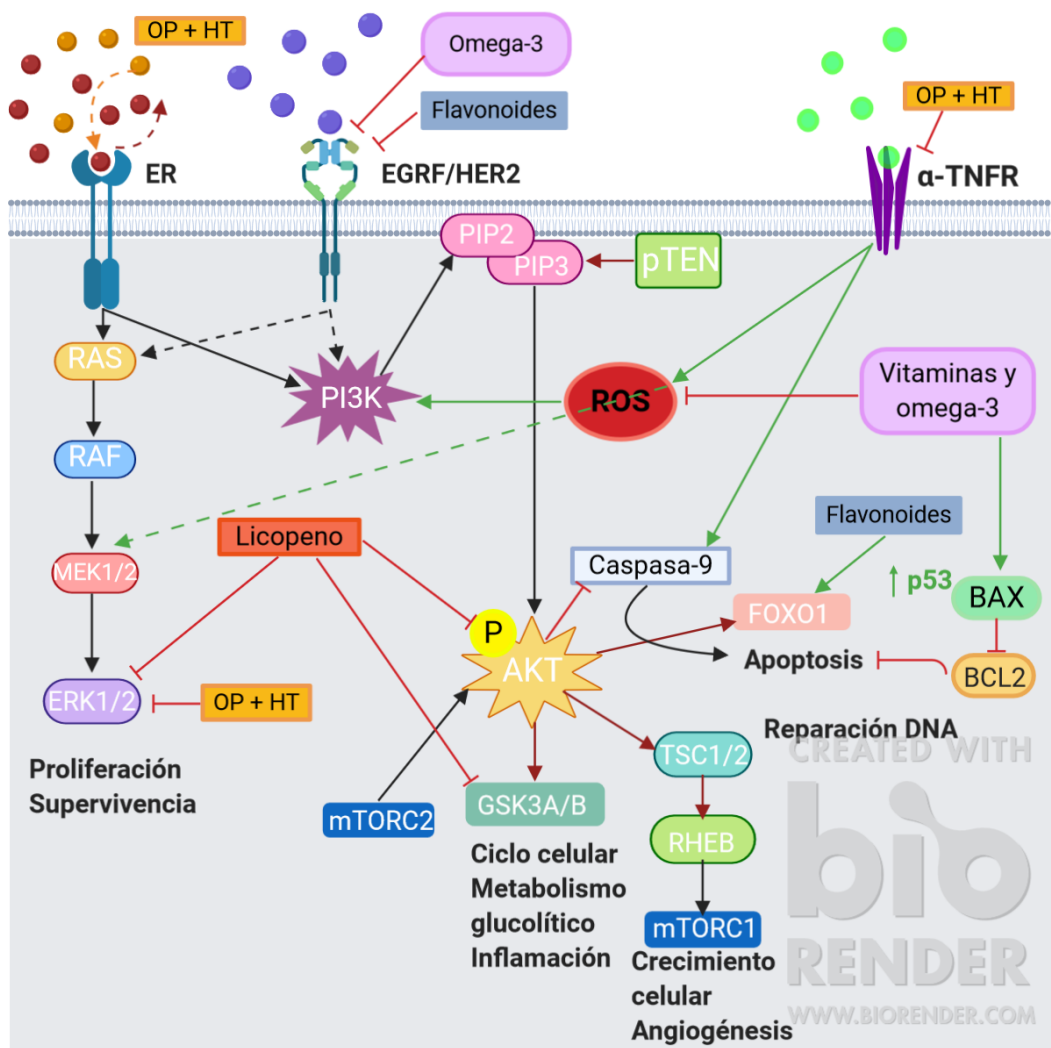


Figura 1. Ruta PI3K-ERK-AKT y TNFR en células cancerosas y las implicaciones de los bioagentes de la dieta mediterránea (creado con Biorender). Basada en la figura original de: «Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer» (Toss, 2015).

diabetes^[9].

Obesidad

Como valor añadido, algunos de estos compuestos previenen la obesidad al activar genes relacionados con la captación y utilización de metabolitos energéticos. Un ejemplo claro es la interacción de estos ácidos omega 3 con el receptor nuclear PPARG (receptor de factores activados por proliferadores de peroxisomas gamma)^[3]. PPARG induce la transcripción de genes que promueven la oxidación de ácidos grasos e inhiben la adipogénesis. Otro ejemplo, es el flavonoide quercetina que aumenta la síntesis de adiponectina, hormona implicada en la captación de glucosa, sensibilidad a insulina y oxidación de ácidos grasos.

Por ello, las dietas occidentales actuales basadas en grasas saturadas o trans y escasez de frutas y verduras contribuyen a condiciones metabólicas como la obesidad, dislipidemia, resistencia a insulina y

Conclusiones

La dieta mediterránea ofrece muchos beneficios por la combinación de moléculas con propiedades positivas para la salud, que se encuentran precisamente en abundancia en alimentos de esta dieta. No obstante, no debemos deleitarnos demasiado con la innumerable lista de beneficios, ya que, para conseguir el máximo efecto, es preciso acompañar la dieta de una rutina diaria de ejercicio y una buena salud psíquica. Por tanto, es crucial entender la dieta mediterránea como un estilo de vida más que como una dieta milagrosa, lo cual no implica que, dadas sus propiedades, pudiera empezar a prescribirse sin reparo como una dieta preventiva contra enfermedades cardiovasculares y cáncer^[9].

Referencias

- [1] Nadtochiy, M. & Redman, E.K. (2011). Mediterranean diet and cardioprotection: the role of nitrite, polyunsaturated fatty acids and polyphenols. *Nutrition*, 27(7-8), 733-744.
 - [2] Perez-Jimenez, F. et al. (13 de Mayo de 2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*, 35(7), 421-424.
 - [3] Rodríguez, M. H., & Gallego, A. S. (1999). Tratado de nutrición. Ediciones Díaz de Santos. ISBN: 84-7978-387-7.
 - [4] . Serra-Majem, L. et al. (2019). Benefits of the Mediterranean diet: Epidemiological and molecular aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 67, 1-55.
 - [5] Moreno-Agostino, D. et al. (2018). Mediterranean diet and well-being: evidence from a nationwide survey. *Psychology & Health*, 34(3), 321-335.
 - [6] Davinelli, S. T. (2018). The potential nutrigenoprotective role of Mediterranean diet and its functional components on telomere length dynamics. *Ageing Research Reviews*, 49, 1-10.
 - [7] Maruca, A. et al. (2019). The Mediterranean Diet as source of bioactive compounds with multi-targeting anti-cancer profile. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 181, 1-23.
 - [8] Pauwels, K. (2011). The Protective Effect of the Mediterranean Diet: Focus on Cancer and Cardiovascular Risk. *Medical Principles and Practice*, 20, 103-111.
 - [9] Toss, A. & Cristofanilli, M. (2015). Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. *Breast cancer research*, 17(60), 1-11.
 - [10] Battino, M. et al. (2018). Relevance of functional foods in the Mediterranean diet: the role of olive oil, berries and honey in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(6), 893-920.
-
-

Ámbito y política editorial

La revista *Encuentros en la Biología* (ISSN 1134-8496) es una revista de divulgación científica con carácter interdisciplinar, está editada por la Universidad de Málaga y publica periódicamente (primavera, verano, otoño, invierno) aquellas contribuciones originales que se enmarcan en un ámbito de encuentro entre las ciencias biológicas y las demás fuentes de conocimiento científico; esto es, conocimiento testado experimentalmente y avalado al menos por una fuente primaria de documentación. Aceptará también la edición de biografías de autores relevantes, de reseñas de libros y trabajos especializados, de imágenes para la portada, la sección «La imagen comentada» y otras secciones especializadas, así como noticias, comunicaciones y eventos relacionados con la biología. La editorial valorará positivamente la contribución de los trabajos en un formato ameno y accesible para estudiantes y profesores de todas las áreas de la biología, al igual que la presentación de las últimas novedades científicas en este área.

Encuentros en la Biología es un foro de difusión abierto para todas aquellas personas que estén interesadas en enviar sus aportaciones. Las contribuciones así presentadas deberán ajustarse a la política editorial y a las normas que a continuación aparecen como «Instrucciones para los Autores». La revista se reserva el derecho a realizar cuantas modificaciones en forma y diseño estime oportunas.

Instrucciones para los autores

1. Todas las contribuciones serán inéditas o contarán con la autorización expresa del organismo que posea los derechos para su reproducción, en cuyo caso la edición incluirá la referencia de su autoría. Los manuscritos recibidos podrían revisarse con medios técnicos para detección de plagios.
2. Cada contribución constará de un título, el nombre completo del autor o autores, su afiliación (institucional, académica o profesional) y correo electrónico. Para distinguir la afiliación de diferentes autores utilice símbolos (*, †, ‡, §, ¶, etc.) después del nombre de cada uno.
3. El documento se puede enviar en formato txt, rtf, sww/odt (OpenOffice/LibreOffice), doc/docx (MS-Word) o tex (L^AT_EX). Manuscritos largos pueden dividirse en varias partes que aparecerían en números distintos.
4. Los nombres de las proteínas se escribirán en mayúsculas y redondilla (ABC o Abc). Los de genes y especies aparecerán en cursiva (*ABC*, *Homo sapiens*). También se pondrán en cursiva los términos que se citen en un idioma distinto al castellano.
5. Los autores que no sean castellanohablantes pueden remitir sus manuscritos en inglés. Una vez aceptado, el equipo editorial elaborará un resumen en castellano.
6. Las tablas, figuras, dibujos y demás elementos gráficos deberán adjuntarse en ficheros independientes. Cuando sea posible, utilice el formato vectorial no propietario pdf, svg, eps o ps. En caso de fotografías o figuras tipo *bitmap* se pueden enviar en formato jpg, tif o png con una resolución mínima de 300 ppp. Existe la posibilidad de incorporar breves animaciones en formato gif a baja resolución.
7. Las referencias bibliográficas se citarán dentro del propio texto, numeradas por orden de aparición, entre corchetes en superíndice^[1]. Al final del mismo, se incluirá la sección de *Bibliografía* o *Referencias* de acuerdo con el estilo del siguiente ejemplo:
¹Einstein Z y Zwestein D. Spatial integration in the temporal cortex. *Res Proc Neurophysiol Fanatic Soc* 1: 45-52, 1974.
 Si hay más de dos autores, se citará el primero seguido de «y otros».
 Si el texto principal no incluye referencias bibliográficas, se ruega a los autores que aporten 3-4 referencias generales «para saber más» o «para más información».
8. Se anima a contribuir a la sección *la imagen comentada* con imágenes originales o de libre distribución (300 ppp de resolución como mínimo) acompañadas en documento aparte con un breve comentario de unas 300 palabras relacionado con la misma (descripción, información, técnica, etc.).
9. Se considerará cualquier contribución para las distintas secciones de la revista.
10. Envío de contribuciones: el original se enviará por correo a los coeditores o a cualquier otro miembro del comité editorial que consideren más afín al tema de la contribución. Como último recurso, se pueden enviar por correo postal acompañados de un CD. No se devolverá ningún original a los autores.
11. La aceptación de todas las contribuciones se hará a petición de los miembros del equipo editorial, manteniendo en todo caso los coeditores la decisión final sobre la misma. También se podrá sugerir al autor mejoras formales o de contenido para adaptar el artículo al perfil de la revista. La notificación se enviará por correo electrónico al autor que figure como corresponsal.