Investigando por un futuro mejor

Alberto Marinas Aramendía (Ed.)

UCOPress
Ediciones Universidad de Córdoba

Investigando por un futuro mejor

Edición a cargo de

Alberto Marinas Aramendía

UCOPress

Editorial Universidad de Córdoba

Coordinador

Alberto Marinas Aramendía

Comité Editorial

Luis Mª Miranda Serrano ● Enrique Soria Mesa ● Marco Antonio Calzado Canales
Mª Ángeles Alonso Moraga ● Vidal Barrón López de Torre
Pilar Font Ugalde ● Álvaro Martínez Moreno

Investigando por un futuro mejor. – Córdoba : UCOPress. Editorial Universidad de Córdoba, 2016.

Editor: Alberto Marinas Aramendía
ISBN : 978-84-9927-291-7

Edita: UCOPress. Editorial Universidad de Córdoba
Campus Universitario de Rabanales
Ctra. Nacional IV, km. 396
14071 – Córdoba, Spain

http://www.uco.es/ucopress
ucopress@uco.es

Diseño y Maquetación: David Sánchez Cruz

Con la colaboración de la Unidad de Cultura Científica y de la Innovación de la Universidad de Córdoba

ISBN : 978-84-9927-291-7

© UCOPress. Editorial Universidad de Córdoba
© Los autores
© Los editores

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de este libro podrá ser reproducida, traducida, almacenada en ningún sistema de recuperación ni transmitida en forma alguna sin el permiso escrito del editor

Contenido

Arte y Humanidades

Capítulo 1. Vida y obra política de Antonio Barroso y Castillo: ascenso social y político de la burguesía provinciana en la Restauración
Marcos Calvo-Manzano Julián 9

Capítulo 2. El papel de la mujer en la economía de la Bética en época Altoimperial
Azahara Córdoba Sánchez 13

Capítulo 3. El cardenal Salazar y su cabildo catedral: primeras aportaciones
María Paloma de las Mercedes Enríquez García 17

Capítulo 4. Evolución del lenguaje de George Orwell en sus textos de autoficción
Miguel Gómez Llorente 21

Capítulo 5. La promoción social de los libertos en la Bética romana y su relación con las élites municipales
María Teresa de Luque Morales 25

Capítulo 6. Sangre, aristocracia y academia en el Jardín de Apolo
Felicia Muñoz López de Lerma 29

Capítulo 7. Wortbildung, Funktionsverbgefügen y traducción en contextos especializados: vitivinicultura
Isidoro Ramírez Almansa 34

Capítulo 8. Nuevo observatorio para un nuevo modelo turístico
Juan Miguel de la Rosa Luque 38

Capítulo 9. Transmisión e intercambios del saber científico en la Edad Media: Desarrollo y estudio de las ciencias al margen o ars notaria en los siglos XII y XIII
Patricia Téllez Francisco 42

Capítulo 10. El Escepticismo como corriente filosófica dominante en la sociedad postmoderna
Celia María Valero Amil 45

Ciencias de la Salud

Capítulo 11. Marcadores moleculares relacionados con el splicing en la detección y estudio de enfermedades metabólicas
Emilia Mª Alors Pérez 50

Capítulo 12. Tratamientos psicológicos basados en la evidencia para trastornos mentales en adultos. Una comparación entre organizaciones internacionales.
Jorge Corpas López 54

Capítulo 13. Estudio comparativo de la prevalencia de tuberculosis bovina en suidos domésticos y silvestres en el sur de España
Carlos Expósito Cárdenas, Ignacio García Bocanegra 57

Capítulo 14. Efecto del tratamiento con metformina sobre los ejes reguladores hipotálamo-hipofisarios en obesidad
Vicente Herrero Aguayo 61

Capítulo 15. Situación epidemiológica de Pestivirus en el Parque Nacional de Doñana: evaluación de la interacción entre rumiantes domésticos y silvestres
Saúl Jiménez Ruiz, Ignacio García Bocanegra, María de los Ángeles Risalde Moya 65

Capítulo 16. Modulación del proteoma redox tiólico por redoxinas: mecanismos e implicaciones en el metabolismo del hierro, la función mitocondrial y la apoptosis
López-Grueso, MJ. & Padilla, CA. 70

Capítulo 17. Evaluación del riesgo por mercurio a partir del aporte por consumo de pescado en España
Alicia Moreno-Ortega, Rafael Moreno-Rojas y Manuel Ángel Amaro López 74

Capítulo 18. Evaluación de distintos protocolos de tinción de ovocitos equinos maduros
Blasa Carmen Pereira Aguilar, Manuel Hidalgo Prieto, Isabel Ortiz Jaraba 78

Capítulo 19. Preparación de muestras para plataformas de Next Generation Sequence (NGS)
Juan Carlos Soto Debrán 83

Capítulo 20. Efectos biológicos de la taurina: ensayos in vivo e in vitro para determinar su potencial quimiopreventivo y protector del ADN
Fernando Valenzuela-Gómez, Marcos Mateo-Fernández, Tania Merinas-Amo, Ángeles Alonso-Moraga 87
Capítulo 21. Detección y localización inmunohistoquímica del receptor de leptina en la glándula paratiroides de ratas
Ángela Vidal, Ana I. Raya, Carmen Pineda, Ignacio López 91

Ciencias Exactas y Naturales

Capítulo 22. Preparación de nanomateriales híbridos quirales y su aplicación a la resolución de mezclas racémicas
J. Amaro-Gahete. D. Esquivel. M.I. López. D. Cosano. J.R. Ruiz. C. Jiménez-Sanchidrián y F. J. Romero-Salguero 96
Capítulo 23. Estudio de la asimilación de cianuro por la bacteria alcalófila Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344
Miguel Ángel Aparicio-Jiménez, Victor M. Luque-Almagro, Conrado Moreno-Vivián, Mª Dolores Roldán Ruiz 100
Capítulo 24. Análisis genómicos y transcriptómicos de la infección por vertilicio en el olivo (Olea europaea)
Díez Aparicio, Ángel; Rodríguez Franco, Antonio 104
Capítulo 25. Detección de la mosca del olivo mediante determinación de feromona en el fruto
Isabel Ferrera Fenoy 108
Capítulo 26. Papel de las nitrato reductasas en el metabolismo nitrogenado de Fusarium oxysporum
Lucía Gómez Gil 112
Capítulo 27. Síntesis y caracterización de grafenos tridimensionales. Aplicación como electrodos en baterías Litio-Azufre
Celia Hernández Rentero 117
Capítulo 28. Caracterización del Subproteoma Redox de Scrobicularia plana
Ana María Herruzo Ruiz 121
Capítulo 29. Funcionalización Superficial de Sustratos Metálicos para la Obtención de Materiales Biocompatibles
Irene Humanes Pérez 125
Capítulo 30. Cambios en los Perfiles Transcripcionales de Citocromos P450 en Ratones Mus spretus Expuestos a p,p'-DDE
Sara López-Bellón, Noelia Morales-Prieto y Nieves Abril 129
Capítulo 31. Calibración de un monocromador
María del Carmen López Cosano 134
Capítulo 32. Efecto de factores que afectan al balance C/N sobre la expresión de la fosforibosil amidotransferasa, que cataliza la primera reacción en la síntesis de novo de purinas y ureidos.
Cristina Mª López Vázquez 139
Capítulo 33. Evolución temporal en Mecánica Cuántica usando la aproximación repentina
Milagros Francisca Morcillo Arencibia 143
Capítulo 34. Mecanismos de nefrotoxicidad por bisfosfonatos. Efecto de la inhibición de la actividad farnesil difosfato sintasa por ácido zoledrónico sobre el sistema de la ubiquinona en células renales
Rosa María Nevado García, Lucía Fernández del Río y José Manuel Villalba Montoro 147
Capítulo 35. Construcción de mutantes en el gen ck2 en Fusarium oxysporum
Juan Carlos Núñez, M. Isabel González, Concepción de la Hera 152
Capítulo 36. Efecto de una dieta funcional enriquecida con probióticos y extracto de dátil sobre la expresión proteica de la dorada (Sparus aurata)
Ana Belén Plata Gómez 157
Capítulo 37. Biomarcadores moleculares de estrés oxidativo para evaluar contaminación ambiental
Rosa María Tarradas Valero, Carmen Michán Doña, José Alhama Carmona 162

Capítulo 38. Desarrollo de un biosensor de flujo lateral para la determinación de residuos de alérgenos en alimentos
Mª del Valle Zurita Lozano, Mª de la Paz Aguilar Caballos 166

Ciencias Sociales y Jurídicas
Capítulo 39. Competencias sociales y emocionales en el alumnado perteneciente a diferentes grupos étnicos-culturales
María Fontans, Izabela Zych y Vicente J. Llorent 171
Capítulo 40. La nueva dimensión de la jurisdicción consultiva del Tribunal Internacional del Derecho del Mar tras su dictamen de 2 de abril de 2015
Eduardo Jiménez Pineda 176
Capítulo 41. Propuesta de análisis para la evaluación de la calidad de los MOOC para la formación permanente del profesorado de inglés como L2
Francisco Javier Palacios Hidalgo 180

Ingeniería y Arquitectura
Capítulo 42. Sistema automático para el cálculo de volumen de infarto cerebral a partir de imágenes de resonancia magnética
Julio Camacho Cañamón 186
Capítulo 43. Clustering de Series Temporales basado en la Extracción de Tipologías de Segmentos
David Guijo-Rubio, Antonio Manuel Durán-Rosal, Pedro Antonio Gutiérrez-Peña, César Hervás-Martínez. 190
Capítulo 44. Emulador de planta eólica basado en un generador eléctrico de inducción con doble alimentación (DFIG)
Manuel Lara Ortiz 194
Capítulo 45. Patrones temporales de los coeficientes de escorrentía volumétricos en cuencas forestales de Puerto Rico
J.I. Migallón, E.V. Taguas, Y.Yuan 199
Capítulo 46. Análisis de la estructura y regeneración del pinar de Pinus nigra subsp. Salzmannii en Puerto Llano, Sierra de Cazorla (Jaén)
Pedro José Pérez Moreno 203

Investigando por un futuro mejor

La investigación es una de las señas de identidad de la Universidad de Córdoba (UCO). La actividad científica de la UCO la sitúa en los primeros puestos de todos los rankings entre universidades españolas, con independencia de los parámetros utilizados.

La UCO presta especial atención a la incorporación de nuevos talentos mediante programas específicos de fomento de las vocaciones investigadoras. Somos conscientes de que el alumnado que en la actualidad se está iniciando en tareas investigadoras está llamado a liderar el futuro y de que sus investigaciones actuales contribuirán al bienestar de las generaciones venideras. Con esta convicción, hemos editado el presente libro electrónico bajo el título "investigando por un futuro mejor". En él se recogen las aportaciones del alumnado de la UCO que, como resultado de su excelencia académica, disfrutó de una beca de colaboración del MECD en el curso 2015/16, una beca de iniciación a la investigación (2014-2016) o una beca semillero de investigación de la UCO (2015/2016).

Las contribuciones se han clasificado por capítulos atendiendo a una de las cinco macroáreas: Arte y Humanidades, Ciencias Exactas y Naturales, Ciencias de la Salud, Ciencias Sociales y Jurídicas, Ingeniería y Arquitectura. No obstante, muchas de las contribuciones tienen un marcado carácter multidisciplinar pues, de hecho, en la actualidad, los diferentes retos que se plantea la sociedad son abordados desde diversos puntos de vista.

Esperamos que este libro, representativo de la investigación llevada a cabo en nuestra universidad, sea de utilidad para otros investigadores y que pueda servirles de inspiración para el establecimiento de sinergias con otros campos del saber.

María Teresa Roldán Arjona

Vicerrectora de Investigación de la Universidad de Córdoba

Arte y Humanidades

Capítulo 1. Vida y obra política de Antonio Barroso y Castillo: ascenso social y político de la burguesía provinciana en la Restauración

Marcos Calvo-Manzano Julián

Director: Dr. Francisco Miguel Espino Jiménez

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Historia Moderna, Contemporánea y de América.

Plaza del Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail: marcoscamaju@gmail.com

Resumen

Este proyecto, dirigido por el Dr. Francisco Miguel Espino Jiménez, se enmarca dentro de la línea de investigación del Departamento de Historia Moderna, Contemporánea y de América de la Universidad de Córdoba denominada "El parlamentarismo en España durante la contemporaneidad". El objetivo fundamental del mismo ha sido el de analizar en profundidad la vida y obra política del diputado y ministro cordobés Antonio Barroso y Castillo (1854-1916), identificándolo, además, como un ejemplo ideal para el estudio del ascenso, consolidación y práctica del poder por parte de la burguesía profesional provinciana –en este caso, cordobesa– en la España de la Restauración. Para ello, se ha procedido al estudio del contexto socio-económico de Barroso y de su familia, relaciones personales, redes clientelares generadas, formación académica, patrimonio, actividad parlamentaria, así como su figura dentro del Partido Liberal-Fusionista. Todo ello ha permitido la reconstrucción de la biografía de uno de los políticos cordobeses más influyentes y de mayor recorrido de dicho periodo y su conexión con el contexto político y social del momento.

Fundamento

El presente trabajo ha sido realizado en el marco de una Beca de Colaboración del Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte concedida durante el curso 2015-2016. Está inscrito en la línea de investigación dirigida por el profesor Dr. Francisco Miguel Espino Jiménez titulada "El parlamentarismo en España durante la contemporaneidad", que forma parte, a su vez, de los estudios desarrollados por la sociedad científica *International Comission for the History of Representative and Parliamentary Institutions*. En él se analiza la vida y obra política del diputado y ministro cordobés Antonio Barroso y Castillo (1854-1916), figura clave –aunque casi desconocida– de la Restauración en Córdoba y con una destacable trascendencia histórica a nivel nacional.

Esta investigación se inserta en dos de las corrientes historiográficas actuales más consolidadas del panorama científico: la Biografía Histórica y la Historia Parlamentaria, ambas englobadas en dos tendencias de amplio recorrido investigador y repercusión historiográfica como son la Nueva Historia Política y la Nueva Historia Social.

La época de la Restauración (1874-1923) supone uno de los periodos más complejos de la Historia Contemporánea de España, por lo que el análisis de las características y comportamientos de la clase política española es fundamental para comprender correctamente este momento. En este sentido, la figura del cordobés Antonio Barroso y Castillo se manifiesta como un caso paradigmático de burguesía profesional provinciana que, desde el dominio de las corporaciones y clientelas locales, es capaz de ascender política y socialmente hasta lograr asentarse en los principales puestos del poder central –en su caso, como diputado durante treinta años prácticamente ininterrumpidos–. Esta clase social, cada vez más consolidada, desempeñó un papel crucial a la hora de sustentar el aparato político-administrativo del Estado durante la Restauración, gracias al ejercicio del caciquismo, su enorme influencia a nivel local y provincial y el desempeño de puestos nacionales, lo cual explica el enorme interés que suscita el estudio de este político y jurista.

Metodología

Pese a tratarse de un trabajo biográfico, este no es un estudio particularista de lo concreto, de lo individual, sino que el valor del mismo viene determinado por la gran utilidad del estudio de los distintos ámbitos de la vida de este político y jurista para profundizar en el conocimiento de la burguesía profesional provinciana.

En cuanto a los pasos metodológicos seguidos, tras seleccionar el tema de estudio, se llevó a cabo un análisis del estado de la cuestión, realizando una consulta y estudio exhaustivo de toda la bibliografía posible relativa a la caracterización general del régimen de la Restauración, haciendo especial hincapié en sus aspectos políticos y sociales, para lo cual se analizaron publicaciones de naturaleza más especializada.

En un segundo nivel, tras perfilar más precisamente la temática y afianzar el marco teórico sobre el que trabajar, se inició la consulta de fuentes de carácter primario, que ha constituido el verdadero núcleo de este trabajo, llevándose a cabo un análisis exhaustivo del Diario de Sesiones del Congreso de los Diputados durante el periodo en que Antonio Barroso y Castillo desempeñó su labor como diputado y ministro (1886-1916), como fuente primordial para realizar un seguimiento de sus intervenciones y actividad parlamentaria y ministerial. Además, también se consultó el Diario de Sesiones del Senado, publicaciones de prensa local y nacional, documentación de archivo procedente del Archivo del Congreso de los Diputados, Histórico Nacional, de la Diputación de Córdoba, Municipal de Córdoba, etc. y diversa

webgrafía. Para sistematizar la información recabada de estas fuentes se llevó a cabo la elaboración de diferentes bases de datos.

Tras la consulta de toda esta información, se procedió a la estructuración y redacción del trabajo, acompañándose el cuerpo principal del mismo con una serie de anexos en los que se han incorporado cuadros y estadísticas que sintetizan y amplían la información aportada.

Resultados

El desarrollo de esta investigación ha permitido aportar conocimiento novedoso en muy diversos aspectos. En primer lugar, se ha podido definir en profundidad el origen familiar y el contexto socioeconómico en el que se desarrolló la infancia y juventud de Antonio Barroso y Castillo. Hijo de Rafael Barroso y Lora, un destacadísimo miembro de la alta burguesía cordobesa y político fundamental del Partido Progresista en la capital y provincia, pronto demostró sus dotes intelectuales y, siguiendo la tradición familiar, se licenció y doctoró en Derecho [1]. Así, desde muy corta edad, Barroso formó parte de la élite cordobesa y ocupó puestos de responsabilidad dentro de las principales corporaciones locales. Además, fue en esta época de juventud cuando inició su andadura en el campo de la política y llevó a cabo su enlace matrimonial con Rosario Sánchez Guerra [2], hermana de José Sánchez Guerra, quien llegaría a ser uno de los "pesos pesados" del Partido Conservador.

Tras varios intentos fallidos por alcanzar el acta de diputado y saltar, así, al ámbito nacional, fue en 1886 cuando, ya siendo miembro del Partido Liberal-Fusionista, resultó elegido [3]. Con apenas veintinueve años comenzaba su andadura como parlamentario y, desde sus inicios, demostró unas dotes como orador muy notables, una gran actividad relativa a trasladar las demandas de las principales corporaciones cordobesas –de las que había formado parte o seguía haciéndolo– al Congreso y una participación activa en diferentes comisiones –incluidas algunas tan fundamentales como las de presupuestos–, además de formar parte del ala del partido más cercana a uno de los grandes prohombres del mismo: Eugenio Montero Ríos, con quien mantuvo una estrecha amistad a lo largo de toda su vida, hecho que queda demostrado tras analizar comportamientos, discursos y prensa.

Dicha relación se explica por la pertenencia de Barroso al Partido Democrático Progresista durante su juventud, antes de alcanzar el acta como diputado en 1886. Dicho partido, liderado por hombres como Cristino Martos o el propio Montero Ríos, que en un principio manifestaba abiertas aspiraciones republicanas, acabaría integrándose en la Izquierda Dinástica y, más tarde, en el Partido Liberal-Fusionista. Por lo tanto, el caso de Barroso evidencia cómo buena parte del republicanismo moderado inició su andadura hacia la aceptación de la monarquía y los principios de la Restauración durante los primeros años de conformación del nuevo régimen.

Durante la última década del siglo XIX, Barroso comenzó a ocupar cargos intermedios dependientes de diferentes ministerios. Así, llegó a desempeñar la función de Director General de Establecimientos Penales –entre 1892 y 1894–, Director General de Correos y Telégrafos –entre 1894 y 1895, y entre 1897 y 1899–, Gobernador Civil de Madrid –entre 1901 y 1902– o Subsecretario del Ministerio de Gracia y Justicia –entre 1905 y 1906–. Tras esta etapa de transición, en 1906 se inició su periodo de madurez política al alcanzar por primera vez una cartera ministerial. En este caso sería la de Gracia y Justicia, durante los fugaces gobiernos de Segismundo Moret y el marqués de la Vega de Armijo entre finales de 1906 y principios de 1907. Durante los siguientes años y hasta su fallecimiento en 1916, desempeñó el cargo de ministro durante diferentes gobiernos en las carteras de Gracia y

Justicia –siendo el ministerio que en más ocasiones dirigió–, Instrucción Pública y Bellas Artes –siendo el propulsor de la creación del "Patronato Nacional de Anormales" [4]– y de la Gobernación.

En lo referente a su actividad caciquil, se han podido demostrar a raíz de esta investigación diferentes acusaciones de coacción llevadas a cabo por sus seguidores en la capital y provincia cordobesa. Además, aprovechó su posición política para promocionar a familiares –como a su propio hijo Eugenio– o amigos. A su vez, el trabajo exhaustivo sobre los diarios de sesiones del Congreso de los Diputados ha permitido identificar el momento de mayor presión política sobre Antonio Barroso, cuando en la primavera-verano de 1912, siendo ministro de la Gobernación, se revelaron unas graves informaciones que apuntaban a que en 1906, aprovechando su reciente nombramiento como ministro de Gracia y Justicia, había intercedido para favorecer a su cuñado José Sánchez Guerra en una acusación sobre falseamiento de actas electorales en el municipio cordobés de Cabra.

Los honores con que se despidió al ilustre cordobés en su ciudad natal cuando falleció el 7 de octubre de 1916 contrastan con la furia con que, en febrero de 1919, una manifestación obrera desembocó en la destrucción del monumento erigido en su honor apenas cuatro meses antes [5]. Se trata este de un ejemplo perfecto para comprender la doble vertiente del político en cuestión como individuo capaz de levantar tanto simpatías como odios entre sus conciudadanos.

Conclusiones

La elaboración de este trabajo ha permitido presentar una serie de aportaciones novedosas a la comunidad científica acerca de la vida y actividad política de Antonio Barroso y Castillo. Podemos sintetizar las ideas generales del estudio en las siguientes conclusiones:

En primer lugar, se observa una verdadera estrategia familiar de promoción social, evidenciándose en el hecho de que, generación tras generación hasta llegar al sujeto de estudio –y siguiendo en sus descendientes–, el estatus económico y social alcanzado se incrementa progresivamente. En segundo lugar, el éxito de la carrera política de Barroso se debió, en gran medida, a su estrecha relación con figuras tan influyentes como Eugenio Montero Ríos, Manuel García Prieto, José Canalejas o José Sánchez Guerra. En tercer lugar, nos hallamos ante un verdadero cacique capaz de mantener leales a sus apoyos en la provincia cordobesa para garantizar su posición en Madrid y decidido a dominar el espacio político en su lugar de procedencia. Finalmente, y a modo de síntesis, podemos definir su figura como una verdadera "correa de transmisión" de las demandas locales y provinciales en el poder central, lo cual generó una relación de beneficios mutuos realmente estables.

Bibliografía

[1] Archivo Histórico Nacional, Expediente académico de Antonio Barroso y Castillo, alumno de la Universidad Central, UNIVERSIDADES, 3665, Exp., 16.

[2] *Diario de Córdoba*, 7-X-1881.

[3] Archivo Municipal de Córdoba, Expedientes de elecciones a diputados a Cortes y senadores (1886), SF/C 00959, leg. 31, f. 26r.

[4] *Gaceta de Madrid*, 24-I-1910.

[5] *Diario Liberal,* 18-II-1919.

Capítulo 2. El papel de la mujer en la economía de la Bética en época Altoimperial

Azahara Córdoba Sánchez

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Ciencias de la Antigüedad y Edad Media.

Plaza del Cardenal Salazar, 3 14071-Córdoba. E-mail: azaharacs@hotmail.com

Resumen

El objetivo de este trabajo se centra en estudiar y dar a conocer la relevancia del papel de la mujer hispanorromana en la provincia romana Bética, concretamente desde un punto de vista económico y social. Con ello, se intentará contribuir al cambio de percepción acerca de la subordinación femenina en el mundo romano antiguo, frente a la mayor abundancia de estudios relacionados con los ámbitos doméstico y religioso. Para ello se ha recurrido a la búsqueda, recopilación y análisis de fuentes primarias jurídicas, literarias, bibliográficas y epigráficas. A su vez, se incluyen en este trabajo aquellos sectores sociales en los que se desenvuelve la mujer hispanorromana más allá de las élites, completando la ausencia de información epigráfica en determinados ámbitos con aquellas evidencias halladas en otras zonas del Imperio Romano, datadas en los dos primeros siglos de nuestra era.

La necesidad de desarrollar este proyecto no solo se basa en contribuir al conocimiento acerca de la cultura romana en la Península Ibérica, sino que también se intentará aportar conocimiento y una interpretación histórica, fruto de la labor investigadora, a las corrientes historiográficas actuales que refuerzan la valoración del papel desempeñado por la figura femenina a lo largo de la Historia.

Fundamento

El principal objetivo sobre el que se orienta este trabajo es el de dar a conocer la intervención de la mujer hispanorromana en las actividades económicas que se desarrollaron en la provincia romana de la Bética, así como la repercusión y relevancia social que dicha participación pudo generar.

El hecho de que se limite el objeto de estudio a los dos primeros siglos del Imperio Romano atiende a la consideración de este periodo histórico como fundamental en el fenómeno de configuración del territorio hispánico como parte del Imperio Romano, en el proceso de romanización del sur peninsular y en el inicio del desarrollo económico de un territorio tan importante como fue la provincia *Baetica*.

Otro de los objetivos de este trabajo es el de intentar indagar acerca del papel socioeconómico que pudieron jugar aquellas mujeres que podrían incluirse en grupos sociales medios y bajos, especialmente a través de los oficios que pudieron desempeñar.

Por tanto, a partir del contraste de estas fuentes epigráficas con los testimonios que han dejado algunos de los autores clásicos, se intentará mostrar la contradicción que se produce dentro de la sociedad romana durante la Antigüedad con respecto al papel que en época Altoimperial jugó la mujer en esta cultura en el ámbito económico y el empeño en impedir, a pesar de ello, el acceso de la misma a la actividad política y judicial.

Metodología

A continuación, se procede a detallar las fases seguidas de forma rigurosa para poder desarrollar este trabajo introductorio a la investigación:

- Recogida, análisis e interpretación, dentro de su contexto histórico, de información documental relativa al ámbito femenino en la Bética romana, compuesta por fuentes literarias procedente de autores clásicos, jurídicas, bibliográficas y epigráficas.

- Búsqueda de fuentes epigráficas vinculadas al objeto de estudio y su contraste con la información que proporcionan las fuentes clásicas.

- Compilación temática del material procurando contrastar, mediante el análisis crítico, serio y riguroso de las fuentes, la información proporcionada por la documentación epigráfica y literaria con la obtenida de la lectura de obras pertenecientes a la historiografía contemporánea.

- Redacción del trabajo, teniendo presentes los anteriores apartados.

Resultados

Los resultados de este estudio se dividen en dos grandes apartados:

En primer lugar, se lleva a cabo un estudio riguroso del marco jurídico y socioeconómico que envolvía a la mujer romana durante la etapa Altoimperial. Dentro de este estudio caben destacar los cambios legislativos aplicados a aquellos ámbitos que afectaban de forma más directa a la mujer romana a nivel jurídico: matrimonio, divorcio y capacidad para recibir dote y heredar.

Debido a los cambios que se venían desarrollando desde el s. II a.C., las mujeres van alcanzando una progresiva “emancipación” que quedará reflejada en cambios legislativos. De estos, el que favorecería en mayor medida a la consecución de una mayor libertad de

actuación de la mujer romana sería la progresiva popularización del matrimonio *sine manus*, favorable al desarrollo de la capacidad de esta para administrar su propio patrimonio. Esto sería fundamental para la participación de las mujeres, especialmente de aquellas pertenecientes a las élites, en el ámbito público a partir del evergetismo, dadas las limitaciones legislativas a las que estaban sometidas en cuanto a la capacidad para desempeñar cargos políticos y jurídicos.

Estos cambios legislativos pasaron a convivir con otros impulsados en época Altoimperial que, en contraste con esa progresiva "libertad" económica, fomentaban la institución matrimonial y familiar [1], de tal forma que las mujeres de las élites se vieron obligadas, en general, a fomentar sobre sí mismas el ideal de matrona romana para mantener el control sobre su patrimonio y su prestigio a nivel social. Esto se vería impulsado por el acompañamiento, hacia esas medidas legislativas, de los textos escritos por los autores clásicos latinos [2, 3].

En segundo lugar, se procede en este proyecto al estudio del papel ejercido por la mujer romana dentro de los distintos sectores económicos que podrían darse en la Bética a partir de la aplicación de una división por sectores sociales, empleando como herramienta el estudio epigráfico.

En Hispania, es la *provincia Baetica* la que aporta un mayor número de epígrafes que hacen referencia a la actividad laboral femenina o a la intervención de la mujer en distintos aspectos económicos de la vida pública. Fuera de la Bética, el mayor número de hallazgos epigráficos también se concentra en los grandes núcleos poblacionales y, en definitiva, en las zonas más romanizadas.

Así, se clasifica en primer lugar el campo de actuación de las mujeres dentro de las élites, dónde cabe destacar especialmente el papel desempeñado por estas en el ámbito del evergetismo [4]. Gracias a la inversión que ejercen estas mujeres de su propio patrimonio, reportan una serie de beneficios a nivel local que se refleja en el recibimiento de honores para sí mismas, en similares condiciones que los varones. Sin embargo, las mujeres de las élites también podrían ser propietarias de negocios. En la Bética tendrían especial relevancia las mujeres vinculadas, directa o indirectamente, con la producción de aceite, vino, y ánforas olearias y/o vinarias destinadas al desarrollo de la actividad comercial por el Mediterráneo. Por último, también se encuentra atestiguado el patronazgo femenino sobre comunidades cívicas o sobre *collegia*. En el caso de Hispania se localiza un solo caso.

En cuanto a aquellas mujeres que se encontrarían dentro de los grupos identificados como "clases medias" se encuentran las mujeres libres que desempeñan profesiones liberales, cuyo testimonio epigráfico es escaso en comparación con el de las mujeres de las élites debido, fundamentalmente, a la capacidad económica. Destaca la identificación, según E. Haley, de un grupo intermedio denominado como *honestae feminae*, de riqueza similar a la de las élites pero sin dicho rango. La dedicación laboral de este grupo se centraría en la propiedad de tierra y de negocios. También cabe destacar la posibilidad de las mujeres de "rango social medio" de pertenecer a los *collegia* y a las sociedades de publicanos [5].

Para culminar este estudio, la atención ha sido centrada en las mujeres pertenecientes a la servidumbre. Así, en primer lugar destacan las libertas, quienes acumulaban en muchas ocasiones grandes patrimonios que invertían en prácticas evergéticas, o bien en negocios. En cuanto a la servidumbre, las esclavas solían estar más ligadas al ámbito doméstico y sexual; precisamente, en la recopilación y análisis epigráficos llevados a cabo para este estudio

destaca la presencia en la Bética de *nutrices* y *ornatrices*. Finalmente, habría que mencionar la existencia del concubinato y el mayor conocimiento sobre el mismo gracias a los testimonios de autores clásicos, especialmente acerca del concubinato imperial.

Conclusiones

La primera conclusión que se puede extraer tras realizar este trabajo de investigación sería el rechazo que se puede aplicar a la visión tradicional sobre la figura femenina en la Antigüedad romana, fruto de los testimonios de los autores clásicos latinos. Así, a pesar del deseo de estos, en su mayoría, por fomentar ese ideal de matrona romana tradicional, las mujeres de los grupos sociales medios y bajos tenían un papel activo en la economía romana, mientras que aquellas pertenecientes a las élites se valían de sus fortunas para participar en la vida pública.

Por otro lado, cabe destacar la gran cantidad de información epigráfica existente en la antigua provincia romana *Baetica*, fruto de la rápida e intensa romanización que vive el mismo. Ello favorece, a su vez, la adquisición de una mayor cantidad de información epigráfica, en este caso, vinculada a la figura femenina. Gracias precisamente a esos testimonios epigráficos, queda patente la importante participación de la mujer en la vida pública municipal en época Altoimperial, destacando el nombre de numerosas mujeres que contribuyeron al desarrollo urbanístico de los municipios de la provincia y que fueron ampliamente honradas por ello.

A nivel socioeconómico, se aprecia una progresiva emancipación de la mujer romana gracias a las medidas legislativas que se venían desarrollando en el Estado romano desde el s. II a.C., las cuales tienen como precedente la expansión territorial romana y la ausencia masculina prolongada en los ámbitos domésticos. Con ello, la mujer romana va adquiriendo una cada vez mayor libertad de actuación que difícilmente podría ser reprimida en época Altoimperial.

Por último, queda reflejado en este estudio la incidencia en la investigación acerca del papel de la mujer dentro de los distintos sectores sociales, teniendo en cuenta las limitaciones que conlleva el análisis de la importancia de las mujeres de rango social medio y bajo en cuanto a fuentes de estudio se refiere.

Bibliografía

[1] DEL CASTILLO, A. (1976): La emancipación de la mujer romana en el S. I d.C., Granada.

[2] MORALES, C., GARCÍA, J. (1986): Plutarco. Obras morales y de costumbres. Ed. Gredos, Madrid.

[3] QUETGLAS, P.J., COLOMA, C. (1986): Tácito. Anales. Ed. Planeta, Barcelona.

[4] MELCHOR GIL, E. (2009): "Mujeres y evergetismo en la Hispania romana", en J. F. Rodríguez Neila (cur.), Hispania y la epigrafía romana, cuatro perspectivas, Epigrafia e Antichità, 26, Faenza, 2009, pp. 133-178.

[5] HEMELRIJK, E.A. (2015): Hidden lives, public personae. Women and Civic Life in the Roman West, Nueva York.

Capítulo 3. El cardenal Salazar y su cabildo catedral: primeras aportaciones

María Paloma de las Mercedes Enríquez García

Directora y tutora: María Soledad Gómez Navarro

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Historia Moderna, Contemporánea y América.

Plaza del Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail: l22engam@uco.es

Resumen

Pretendemos con este trabajo, fruto de sendas becas de Iniciación a la Investigación y de Colaboración, dar un paso previo a la completa redacción de una biografía del cardenal Salazar, concretándolo en el análisis de las relaciones entre el cardenal y su cabildo, para lo cual es imprescindible comprender determinados matices del cabildo catedralicio cordobés como su definición, composición, características, funciones, intervinientes, asuntos a solventar, capacidad de actuación, influencia en la ciudad de Córdoba y su entorno y estado de sus relaciones con las restantes instituciones eclesiásticas, las de naturaleza civil y, por supuesto, con la sociedad cordobesa de finales del siglo XVII y principios del siguiente. El primer resultado de esta investigación se ha plasmado en mi Trabajo de Fin de Grado, recientemente defendido, y será ampliada con mi Trabajo de Fin de Máster y mi Tesis Doctoral.

Fundamentos

Se resumen en los siguientes: analizar la Córdoba y a la persona del cardenal Salazar como enmarques indispensables de contexto para su actuación como prelado, estudiar el cabildo catedralicio cordobés como institución e imprescindible contexto institucional a la labor de Salazar y examinar y explicar el cabildo catedralicio a través de la sociedad que pasa por él y sus inquietudes durante tres años testigos elegidos como estrategia metodológica de un primer acercamiento a su figura: 1686 - 1687; 1696 - 1697 y 1705 - 1706.

Metodología

El primero de los cuatro pilares en los que este trabajo se basa para su elaboración es el análisis de fuentes primarias; actas capitulares de tres de los veinte años en los que Salazar fue obispo de Córdoba, que se conservan en el archivo capitular de la catedral de Córdoba y que son imprescindibles para esta investigación archivística inédita. El segundo grupo de fuentes son las secundarias, las cuales primero desde una perspectiva general para desembocar en otra particular, nos revelan pinceladas de la Historia de la Iglesia en el Antiguo Régimen en Europa y España respectivamente.

También hemos consultado bibliografía especializada -o dicho de otra manera, un nutrido recorrido historiográfico que recoge las averiguaciones de señeros exponentes de la prelacía hispana moderna como Barrio Gozalo, Domínguez Ortiz, García - Cuevas Ventura, Latorre Ciría, Morgado García o Vázquez Lesmes. Será una selección de diez ejemplares los que citemos en el apartado dedicado a la bibliografía, de acuerdo a los requisitos exigidos- y, aunque de forma muy eventual, ciertos recursos virtuales cuya presencia se reduce al mínimo en el trabajo dada la insuficiente envergadura de su contenido.

Resultados

A continuación explicaremos escuetamente los intervinientes, la temática y la dinámica que jalonan la tónica del cabildo catedralicio cordobés durante los tres años estudiados del episcopado del prelado - cardenal Salazar.

Intervinientes

A lo largo de los tres años testigos, advertimos, estudiando el volumen global de los intervinientes físicos que actúan en el cabildo catedralicio cordobés, que de los trescientos veintiséis individuos que en total constan en las actas capitulares, en lógica consonancia con la naturaleza de la documentación analizada, doscientos cuarenta y nueve son eclesiásticos, sesenta y tres pecheros, diez nobles y tres miembros de la realeza. Todos ellos acuden al cabildo por motivos que van desde cuestiones internas del cabildo -como personal y economía- hasta asuntos de carácter asistencial, caritativo, político y judicial.

Lo propio se muestra también en el volumen global de las instituciones presentes en la documentación. De las veintisiete instituciones que conforman el total de las personas jurídicas registradas en las actas, veintidós son eclesiásticas y cinco laicas, teniendo, dentro de las primeras un mayor predicamento, los cabildos catedralicios con los que Córdoba interactúa por múltiples cuestiones como la de las gracias de subsidio y excusado -tema muy recurrente en las actas a lo largo de los años-; y si analizamos la representatividad de las instituciones civiles, comprobamos el predominio de los concejos municipales -como los de Córdoba y Puebla de Alférez por rogativas pidiendo la lluvia o por impago de deudas- sobre cualquier otro organismo de esta clase.

Asuntos

De las temáticas que jalonan el proceder cabildicio, haremos notar su variada tipología y su reparto de manera relativamente uniforme durante el grueso de los tres años, pese a encontrar, en lógica consonancia con la naturaleza de la documentación examinada, asuntos relacionados con interinidades del cabildo -personal y economía fundamentalmente- frente a otras casuísticas como las vinculadas a asistencia social y al clero diocesano, a la gestión de pleitos y a las relaciones con una amplia gama de instituciones eclesiásticas -los cabildos diocesanos españoles y ultramarinos y la Santa Sede- y otras tantas de naturaleza civil -concejos municipales, entre otras-.

Lo anterior transcurre teniendo como telón de fondo las tensas relaciones entre el cardenal Salazar y su cabildo catedral, contenidas en treinta ocasiones en las actas partiendo de este axioma: un constante e intenso juego de fuerzas por la obtención de la hegemonía cabildicia, lo que marcará las líneas de actuación del prelado durante los tres años examinados, empezando por un saneamiento de cuentas de la economía capitular -verdadera obsesión de Salazar- como instrumento para controlar este órgano junto con nombramientos y destituciones a dedo, llegando a tejer una imponente red clientelar.

Pero también van a ser muy célebres sus tiranteces con sus capitulares por cuestiones protocolarias -y prueba de ello es lo ocurrido el miércoles de ceniza de 1687, cuando, con motivo de su toma de posesión de su mitra en Córdoba, Salazar, único caso en la mencionada ciudad de cardenal y obispo, exige se le coloque un dosel púrpura como símbolo de respeto a su dúplice dignidad siempre que predique en el púlpito de la catedral cordobesa- sus interferencias en cuestiones de exclusiva competencia cabildicia -como es la gestión de pleitos-, sus múltiples imposiciones a su curia y sus frecuentes visitas pastorales a lo largo de sus dominios acompañado de personas que le son leales, como el canónigo don Juan Antonio de Victoria.

Dinámica

Procediendo con la dinámica, ahora estudiaremos sucintamente la evolución cronológica de los intervinientes -físicos y jurídicos- y de los asuntos que dirime el cabildo catedralicio cordobés durante el período analizado. Sobre los intervinientes, lo único que debemos añadir es que dentro de éstos, los que tienen una mayor continuidad en las actas son todos los que en personas y/o en instituciones, tienen que ver con lo eclesiástico, pero también, aunque más intermitentemente, se aprecia igualmente un seguimiento de los restantes estamentos sociales y de sus correspondientes instituciones. Con respecto a los asuntos, debemos señalar que no es que una misma casuística se repita en la documentación prolongadamente, dadas la pérdida del rastro en las actas de muchos temas con el paso de los años y la rápida mecánica del ente cabildicio en la resolución de los retos que le son planteados, de aquí que digamos que su tipología es variada y su reparto relativamente uniforme en los documentos estudiados.

Coclusiones

Como primera consideración, pondremos de relieve el condicionamiento de la actuación episcopal del cardenal Salazar tanto por la sociedad de su época como por su propia persona. Lo que los problemas de su tiempo son para la sociedad cordobesa, lo son las disposiciones postridentinas para el purpurado, con todo lo que ello implica en la capacidad resolutiva cabildicia de los problemas de su ciudad. Una segunda reflexión es la constatación del carácter y comportamiento institucional del cabildo catedralicio cordobés durante la horquilla cronológica estudiada pese a las tiranteces que mantiene con su obispo en época de Salazar.

También a lo largo de esta investigación, hemos podido intuir ciertas claves del cabildo catedralicio cordobés concernientes a su cercanía con su ciudad y sus prolíficas relaciones con las distintas instituciones ya sean eclesiásticas o laicas. Por último, no podemos, para terminar, omitir la perfecta extrapolación que de la tónica imperante en el cabildo catedralicio cordobés podemos ver en los restantes cabildos diocesanos españoles, pese a las en ocasiones extremas tiranteces entre el cardenal Salazar y sus subordinados.

Bibliografía

[1] M. Barrio Gozalo, *El clero en la España moderna*, Caja de Ahorros del Monte de Piedad de Córdoba - CSIC, Córdoba, (2010).

[2] A. Domínguez Ortiz, *Las clases privilegiadas en el Antiguo Régimen: el clero*, II, Istmo, Madrid, (1985).

[3] J. García - Cuevas Ventura, *El cabildo catedralicio cordobés desde la revolución a la Restauración (1788 - 1882)*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, 1996.

[4] S. Gómez Navarro "El cardenal Salazar y la política proborbónica de su tiempo" en S. Gómez Navarro (coord.), *Estudios de Historia Iberoamericana II. XXXIV Reunión Anual de la Society for Spanish and Portuguese Historical Studies (SSPHS)*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba / Cajasur, Córdoba, (2004), 224 - 229.

[5] ---, "Empezando a pastorear: la mission del cardinal Salazar en la Salamanca de 1682", en J. M. de Bernardo Ares, (coord.), *La Sucesión en la Monarquía Hispánica, 1665 - 1725: Lucha política en las Cortes y fragilidad económica - fiscal de los Reinos*, vol. 1, Universidad de Córdoba - Cajasur, Córdoba, (2006), 128 - 134.

[6] A. Morgado García, *Ser clérigo en la España del Antiguo Régimen*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz, (2000).

[7] R. Vázquez Lesmes, *Córdoba y su cabildo catedralicio en la Modernidad*, Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, Córdoba, (1987).

Capítulo 4. Evolución del lenguaje de George Orwell en sus textos de autoficción

Miguel Gómez Llorente

Universidad de Córdoba. Facultad /Escuela de Filosofía y Letras. Departamento de Filología Inglesa y Alemana.

Plaza del Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail: i12gollm@uco.es

Resumen

El objetivo de este proyecto ha sido principalmente el análisis de aquellas obras que han recibido menos atención del escritor inglés George Orwell. Estas obras de carácter ensayístico y autobiográfico son *Down and Out in Paris and London*, *The Road to Wigan Pier* y *Homage to Catalonia*. El análisis se ha centrado en la concepción del lenguaje del propio autor, que fue sistematizada por el propio Orwell en su célebre ensayo *Politics and the English Language* publicado en 1949. Se ha intentado demostrar cómo esta "teoría del lenguaje" no surge repentinamente, sino que se va desarrollando a lo largo de los años en sus distintas obras en forma de reflexiones metalingüísticas aisladas. Estas reflexiones han sido el objeto principal de estudio. En primer lugar han sido identificadas, posteriormente clasificadas y finalmente descritas en lo que se expone a continuación. Aparte de los textos mencionados anteriormente, se han tenido en cuenta además algunos de los ensayos de Orwell tales como *Why I write* y el ya mencionado *Politics and the English Language*.

La presente comunicación corresponde al proyecto iniciado con motivo de la concesión de la I Beca Semillero de Investigación de la Universidad de Córdoba. Este proyecto ha consistido en el análisis de los textos considerados como autobiografismo ensayístico publicados por el escritor y periodista británico George Orwell en los años 30 (*Down and out in Paris and London* (1933), *The Road to Wigan Pier* (1937) y *Homage to Catalonia* (1938)). Además de dichos textos, se han tenido en cuenta algunos ensayos del propio autor, así como la obra de ficción por la cual este autor es más conocido, *Mil Novecientos Ochenta y cuatro* (1949).

El análisis se ha centrado en aquellos fragmentos de reflexión metalingüística en los que Orwell otorga pistas acerca de su concepción del lenguaje. Esta teoría sobre el lenguaje es posteriormente sistematizada por el propio Orwell en su ensayo *Politics and the English Language* (1948). Uno de los principales objetivos de este proyecto ha sido demostrar que esta teoría del lenguaje no surge de forma repentina en el ensayo mencionado anteriormente sino que se va desarrollando poco a poco a lo largo de su breve carrera como escritor. El interés de George Orwell por el lenguaje es constante en toda su obra y se puede apreciar en su ensayo *Why I write* (1947), que también ha sido tenido en cuenta en el desarrollo de este proyecto.

Además de la lectura de cada una de las obras principales en dos ocasiones, también se han considerado los pasajes más relevantes de *The langauge of George Orwell*, de Roger Fowler. Tras la recopilación de las reflexiones metalingüísticas encontradas en las distintas obras, se procedió a su análisis y clasificación teniendo en cuenta algunos de los criterios que el propio Orwell establece en *Politics and the English Language*.

La primera de las obras principales a las que se hizo referencia al principio (*Down and out in Paris and London*) es quizás la que menos contenido metalingüístico alberga, centrándose casi en exclusiva a la narración de los acontecimientos que le suceden al autor. Sin embargo, el capítulo XXXII está dedicado únicamente al análisis por parte de Orwell de la jerga y el lenguaje obsceno que se usaban en Londres en los años 30.

Orwell hace referencia a la rapidez con la que este tipo de lenguaje evoluciona con el tiempo y se aventura, erróneamente, a pronosticar la eventual desaparición del adjetivo grosero que más se utilizaba en aquel momento: *fucking*. A pesar de ello, este adjetivo se ha mantenido durante los años y aún hoy en día se trata de una de las palabras más frecuentes en el inglés coloquial, ya sea entre hablantes nativos o no nativos

Sin embargo, el aspecto en el que el autor se centra en este capítulo es la completa pérdida de sentido y significado que sufre una determinada palabra una vez se convierte en un insulto. La palabra, según Orwell, no significa un insulto en sí misma; se trata de un insulto únicamente porque se expresa con esa intención. Este es precisamente uno de los problemas que George Orwell señala como causante del empobrecimiento de la lengua inglesa, el vacío semántico de muchas palabras. Este aspecto será desarrollado más adelante.

La segunda de las obras principales que han sido analizadas es *The Road to Wigan Pier*. Encontramos dos partes muy diferenciadas en esta obra, por un lado, el relato (eminentemente narrativo) de sus experiencias con las clases trabajadoras del norte industrial de Inglaterra, y por otro, una crítica del estado del socialismo en aquel momento y los motivos por los cuales no llegaba a imponerse a otros sistemas políticos. Esta segunda parte es por supuesto mucho más rica desde el punto de vista del presente proyecto, sucediéndose las reflexiones metalingüísticas una detrás de otra.

Sin embargo, merece la pena referirse a una de estas reflexiones que aparece en la primera parte. (Todas las citas han sido traducidas del inglés) "Las palabras son algo tan débil. ¿Cuál es el sentido de una frase corta como "el techo gotea" o "cuatro camas para ocho personas"?. Es el tipo de cosa que nuestro ojo pasa de largo sin registrar nada" [2]. Orwell intenta enfatizar el hecho de que las palabras por sí solas no pueden dar cuenta de forma precisa de la situación real en la que vivían las clases trabajadoras inglesas en los años 30. A pesar del poder que el lenguaje puede llegar a tener, hay situaciones que no se pueden conocer realmente a no ser que sean vividas en primera persona.

Orwell establece una estrecha relación, especialmente en la segunda parte de *The Road to Wigan Pier*, entre el acento (considerado un aspecto de lenguaje) y la pertenencia a una determinada clase social. Según Orwell, "la gente de clase media no podía permitir que sus hijos crecieran con acentos vulgares"[2]. Este hecho no solo acentúa las diferencias entre las distintas clases sociales, sino que además genera un clima de odio hacia las clases más bajas. Este odio, sin embargo, no era recíproco en su mayor parte. El propio Orwell, que poseía un acento de clase media (a lo que él mismo se refería como "pronunciar las aches"), temía ser rechazado por aquellos miembros de las clases trabajadoras a los que no solo entrevistó, sino con los que además convivió. A pesar de ello, el autor se refiere numerosas veces al buen trato que recibió en general por parte de todas estas personas.

Uno de los aspectos más destacados en *Politics and the English Language* como responsable de la pobreza del inglés es la proliferación de la jerga política, especialmente de la jerga comunista y socialista. Él mismo describe este tipo de jerga como "horrible" y lo considera uno de los causantes del fracaso del socialismo. Orwell menciona varias expresiones para las que no encuentra significado y que no hacen sino repeler a los potenciales defensores del socialismo. Expresiones como 'ideología burguesa', 'solidaridad proletaria', 'necesidad histórica' y especialmente la palabra 'camarada' carecen de significado por si mismas pero aun así son capaces de introducirse en el discurso diario empobreciendo el lenguaje. También encontramos dentro de este grupo aquellas palabras utilizadas supuestamente para referirse a determinados movimientos y que al igual que las expresiones anteriores carecen de un significado preciso. Estos términos se reconocen fácilmente al ser creados en su mayoría por medio del sufijo –ismo: "pacifismo, internacionalismo, humanitarianismo"[2]. Estos aspectos conforman lo que Orwell denomina "palabrería proletaria además de alertar del riesgo que esto supone. Orwell se refiere a la lengua inglesa, sin embargo, esto es algo que se ha extendido en todas las lenguas y de una forma mucho más contundente. Cualquier documento oficial (no necesariamente de carácter político) de cualquier administración es una secuencia de palabras y expresiones cuyo significado es vago e impreciso, y que hacen del documento algo indescifrable.

En la última de las obras principales de Orwell que se han analizado, *Homage to Catalonia*, también encontramos este problema. Orwell se refiere esta vez a las "estereotipadas expresiones de la revolución" que formaban parte de la propaganda comunista y especialmente anarquista de la que fue testigo durante su estancia en Barcelona durante la guerra civil española.

En el apéndice primero de esta obra Orwell critica la enorme cantidad de partidos políticos y sindicatos de ideología similar que había en España en ese momento. Cada uno contaba con sus iniciales, algo que desquiciaba al propio Orwell que se refería a la situación de la siguiente manera: "A primera vista parecía que España estaba sufriendo una plaga de iniciales" [3].

Es importante tener en cuenta la época en la que se desarrolló la carrera literaria y periodística de George Orwell. La primera guerra mundial, la revolución rusa y la guerra civil española dieron lugar a multitud de movimientos revolucionarios cuya arma principal era la propaganda. Esto unido a la todavía altísima tasa de analfabetismo que sufría Europa dio lugar a un empobrecimiento del lenguaje. Sin embargo, la propaganda sigue siendo uno de los pilares que sustentan a los partidos políticos con lo cual el empobrecimiento del lenguaje continúa y se dirige irremediablemente hacia un lenguaje vacío, lleno de términos y expresiones que realmente no significan nada. Esto es precisamente lo contrario de lo que Orwell promulgaba en su ensayo *Why I write*, en el que define como característica principal del lenguaje la precisión y la transparencia.

Bibliografía

[1] G. Orwell, Down and Out in Paris and London (1933).

[2] G. Orwell, The Road to Wigan Pier (1937).

[3] G. Orwell, Homage to Catalonia (1938).

[4] G. Orwell, The Decline of the English Murder and Other Essays (1980) 180-188.

[5] R. Fowler, The language of George Orwell. (1995).

Capítulo 5. La promoción social de los libertos en la Bética romana y su relación con las élites municipales

María Teresa de Luque Morales

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Ciencias de la Antigüedad y Edad Media.

Plaza Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail: tetedeluque@gmail.com

Resumen

En el presente trabajo pretendemos realizar un estudio de los medios de promoción social utilizados por los libertos y de las relaciones que los miembros de este grupo social pudieron mantener con las aristocracias municipales, utilizando la documentación epigráfica conservada en la provincia romana de la Bética.

Los libertos con recursos económicos buscaron mejorar su posición social y preparar la promoción de sus descendientes utilizando los medios que tenían a su alcance, como el evergetismo, el desempeño de la Augustalidad y la obtención de honores municipales. Ellos eran conscientes de que las élites municipales necesitaban de su implicación para ayudar a financiar la costosa vida municipal, por ello, siempre estuvieron dispuestos a aceptar *munera* (obligaciones, cargas) a cambio de mejorar su estatus personal y familiar.

Por lo señalado, nuestro objetivo consistirá en buscar y analizar la documentación existente que muestre los mecanismos empleados por los libertos ricos para promocionar en las ciudades de la Bética. Igualmente, intentaremos argumentar si estos procesos pudieron verse culminados y en qué medida.

Fundamento

El principal objetivo sería conocer, interpretar, e insertar en su contexto histórico las fuentes manejadas, contrastando la información. Partiendo de este objetivo general, los objetivos específicos de este trabajo son:

En primer lugar, profundizar en el conocimiento de nuestro tema a partir de la bibliografía contemporánea.

En segundo lugar, ofrecer una recopilación de inscripciones relativas a los libertos de la provincia Bética romana, constituyendo así un *corpus* documental sólido.

En tercer lugar, analizar dichos documentos e insertarlos en su contexto histórico.

Por último, conocer los diferentes tipos de libertos y de promoción social presentes en la Bética romana.

Metodología

Para poder desarrollar este trabajo de introducción a la investigación, se ha procedido a establecer las siguientes fases:

Una primera de recogida de información documental relativa a los libertos en la Bética romana: fuentes literarias, jurídicas y epigráficas. Dicha documentación ha sido analizada, interpretada e insertada en su contexto histórico para comprender el papel desempeñado por estos libertos en su contexto social, económico, político y cultural.

Una segunda de recopilación, lectura y estudio de la bibliografía existente sobre estos libertos y la promoción social. Asimismo, se ha procedido a buscar otras fuentes primarias sobre el tema de estudio, como la obra *Institutiones* de Gayo o el *Digesto* de Justiniano.

Una tercera donde se ha realizado una compilación por temas de todo el material existente sobre el tema tratado, procurando contrastar, mediante el análisis crítico, la información proporcionada por la documentación epigráfica y literaria con la obtenida de la lectura de las principales obras de la historiografía contemporánea.

Una última en la que teniendo presentes los anteriores apartados, se ha redactado el trabajo.

Resultados

Un liberto es un esclavo manumitido por su amo, quien pasaría a ser su patrón [7]. Tras haber conseguido la libertad, tendría una serie de derechos y obligaciones, entre ellas, honrar a su patrón, al igual que éste debía apoyarlo en caso de que lo necesitase. Sin embargo, a pesar de haber conseguido la libertad, el liberto tenía una serie de restricciones, como la prohibición al acceso al senado local o la legión.

Respecto a los tipos de libertos, debemos nombrar en primer lugar a los libertos imperiales. Estos se identifican por ser miembros de la *familia Caesaris* [1], es decir, libertos del emperador o de sus familiares más cercanos, por lo que el *Augusti libertus* formaría parte de un grupo privilegiado [2]. Según las fuentes epigráficas, la mayoría de ellos ocuparían los servicios administrativos y fiscales, en los puestos medios e inferiores, donde habría cierta especialización [6]. En su ámbito social, encontramos homenajes del *ordo* a estos libertos imperiales por su buena acción, o a sus hijos, como el caso de *Titus Flavius Antoninus*, a quien le concedieron los honores fúnebres, honor que compensaría a su familia, pues su hijo podría haber entrado en el senado local al ser de nacimiento libre (*CIL* II^2/7, 290).

Sobre los libertos públicos, son aquellos manumitidos por una colectividad que se convierte en su patrono [2]. Contarían con una posición privilegiada dentro del municipio al estar muy integrados por sus conocimientos y participación activa en éste. Asimismo, ocuparían cargos administrativos, al servicio de colegios sacerdotales o de la administración pública, al igual que muchos de ellos seguirían trabajando junto a los esclavos [2]. Por ejemplo, *Aulus Publicius Germanus* fue sacerdote de una asociación religiosa y funeraria formada por esclavos y libertos públicos (*CIL* II^2/7, 315).

Respecto a los libertos privados, se destaca su autonomía económica tras la manumisión. Los encontramos en profesiones del mundo rural y urbano, como la minería, producción y comercialización de aceite, etc. Además, hay que destacar la estrecha relación que existía entre el liberto y su patrón [6], tal y como nos manifiestan las fuentes epigráficas. Por ejemplo, este sería el caso de *Valeria Actes* (*CIL* II^2/5, 294 *y CIL* II^2/5, 296).

Asimismo, debemos hablar sobre la Augustalidad, sacerdocio al que podía acceder el liberto en busca de aumentar su estatus [5], cuya función era dar culto al *Genius* y *Numen Augusti.* Para alcanzar este cargo eran muy importantes las donaciones *ob honorem* [1, 4], pues si conseguían ocuparlo, debían realizar todo aquello que habían prometido. Así, encontramos Augustales que realizan actividades evergéticas y, a cambio, el senado local les otorga los *ornamenta decurionalia* (*CILA* II, 1209).

Sobre los libertos y los senados municipales, como vemos en la *Lex Visellia de libertinis*, los libertos tenían prohibido el acceso al *ordo decurionum* [1]. A pesar de ello, estos libertos buscan aumentar su estatus invirtiendo su riqueza en la compra de tierras y en la munificencia cívica, es decir, actividades evergéticas para que el senado le concediera algún tipo de honor, consiguiendo visibilidad y reconocimiento ante el pueblo [3]. Así, los honores más comunes serían las estatuas, el funeral público y los *ornamenta decurionalia,* los honores más importantes que un liberto podía recibir ya que poseerían los mismos privilegios que un decurión sin ejercer el cargo [3]. Por tanto, si ellos conseguían estos honores, facilitaban a su descendencia el acceso al senado local. Un ejemplo de este evergetismo lo tenemos con *Acilia Plecusa*, liberta que tras la muerte de su marido se encarga de mantener el prestigio de su *gens* a través de la munificencia (*CIL* II^2/5, 780 y *CIL* II^2/5, 782).

Conclusiones

En primer lugar, respecto a los libertos imperiales, podrían considerarse una élite dentro de lo que podríamos definir como el *ordo libertinorum.* Al ser conscientes de su situación, se muestran orgullosos de su origen y posición. Sobre su horizonte de progreso y promoción personal, está muy limitado, pues como un funcionario sólo debe obedecer fielmente las órdenes de un superior. Su mentalidad es resultado de condiciones especiales, ya que la mayoría de ellos han nacido dentro de la misma *familia Caesaris,* formados en ella con vista a unos puestos y actividades muy concretas. Por ejemplo, la manumisión para ellos no suponía el cambio en sus vidas que sí suponía para el resto, significando, sobre todo, poder optar a una serie de puestos más elevados dentro de la burocracia imperial. No se debe olvidar que su alcance dependerá de la voluntad de sus superiores y de la libre decisión del *princeps.*

En segundo lugar, debemos referirnos a los libertos públicos. Lo primero que debemos señalar es la diferencia que muestran con respecto a los libertos imperiales, pues aunque a veces se incluyan en el mismo grupo, la actitud de los libertos públicos de cara a la vida sociopolítica de las ciudades es diferente. Podemos ver que estos libertos aparecen más integrados en el municipio, contribuyendo en sus escalas de valores y persiguiendo ahí sus

posibilidades de carrera y promoción. Presentan una visión social amplia, aspiran a los más altos cargos a los que un liberto puede alcanzar en un municipio y participan en la vida pública, siendo finalmente honrados y recompensados. Así, los descendientes de los libertos públicos pudieron aprovechar la labor paterna y acceder a las magistraturas municipales.

En tercer lugar, debemos hablar sobre los libertos privados, en los que su independencia se revela en la posibilidad de suministrar su propio dinero para una mayor autonomía. Estos libertos son los que proporcionan mayor número de documentos, la gran mayoría relacionados con los Augustales, por lo que se refuerza la idea de considerar a esta institución la vía principal de participación de los libertos en la dinámica sociopolítica municipal.

Por último, centrándonos más en la búsqueda de promoción y ascenso social, podríamos decir que para los libertos era prácticamente imposible alcanzar el rango decurional de forma efectiva. Sus descendientes, *ingenui,* ya sí podrían legalmente ejercer cargos municipales y conseguir formar parte del *ordo*. Según los testimonios conservados, en la práctica son muy pocos los descendientes de libertos que acceden, o al menos que hayan dejado evidencias de conseguirlo. No cabe duda de que ser hijo de liberto conlleva ese lastre servil, por lo que la tercera generación lo tendría más fácil para acceder a las magistraturas.

Sobre la integración honorífica de estos libertos y de sus descendientes en el *ordo,* obtenemos mejores resultados. La mayoría se integra gracias a los *ornamenta* municipales y gran parte son Augustales, pero, dentro de ellos, muy pocos obtendrían esos privilegios que los convertirían en decuriones honorarios. Asimismo, quienes los consiguen son en su mayoría libertos independientes que muestran un alto nivel tanto económico como social, el cual permite que puedan promocionarse hacia esa máxima posición que podía lograr un liberto. Así, hemos podido comprobar la presencia activa e interés de los libertos, principalmente ricos, en la dinámica sociopolítica de las ciudades, manifestando un patriotismo municipal y el evidente deseo de ascender en la jerarquía ciudadana.

Bibliografía

[1]ALFÖLDY, G., Nueva historia social de Roma, Sevilla, 2012.

[2]HERNÁNDEZ GUERRA, L., Los libertos de la Hispania romana: situación jurídica, promoción social y modos de vida, Salamanca, 2013.

[3]MELCHOR GIL, E., Evergetismo en la Hispania romana, Córdoba, 1993.

[4]MELCHOR GIL, E., El mecenazgo cívico en la Bética: la contribución de los evergetas al desarrollo de la vida municipal, Córdoba, 1994.

[5]MOURITSEN, H., The freedman in the Roman world, Cambridge, 2011.

[6]SERRANO DELGADO, J. M., Status y promoción social de los libertos en Hispania romana, Sevilla, 1988.

[7]KNAPP, R., Los olvidados de Roma: prostitutas, forajidos, esclavos, gladiadores y gente corriente, Barcelona, 2011.

Capítulo 6. Sangre, aristocracia y academia en el *Jardín de Apolo*

Felicia Muñoz López de Lerma

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Literatura Española.

Plaza del Cardenal Salazar, 3 14071-Córdoba. E-mail: feliwu.mll@gmail.com

Resumen

En la edición de las actas de una academia de mediados del siglo XVII apreciamos la dialéctica de la sangre como indicio de una revitalizada ideología nobiliaria, tras el desplazamiento de la vieja aristocracia por la mentalidad humanista, el ascenso de los letrados y el nuevo mundo de la corte. Tras la caída de Olivares y su empresa recentralizadora del poder regio y, de otro lado, el agotamiento del discurso de base idealista, la nobleza de linaje (la de la sangre) retoma posiciones en el discurso político y cultural, convirtiendo las prácticas académicas y la poesía propia de ellas en un cauce privilegiado para la constitución de un nuevo discurso. En poesía, sobre la base de los elementos del alto Barroco, de salida del yo íntimo al invertir la tradición renacentista, y hacer de lo burlesco materia poética, se inicia una deriva, desde los años cincuenta del seiscientos, en la que la corporalización y la materialidad denotadas por la presencia de la sangre representan en los versos una marca significativa.

Fundamento, Metodología, Resultados y Conclusiones

Nuestras expectativas se ven frustradas cuando leemos poesía académica del siglo XVII. No conectamos con la general formulación dispersa y extravagante de conceptos aparentemente irrelevantes en una primera ni en una segunda lectura. Quizá por ello la relativa escasez de críticos que se han preocupado del tema: a los estudios de King y Sánchez en los años 60 se suman otros sobre academias locales, y artículos sobre aspectos particulares. Puede que la profusión de material sea una de las causas de la laguna. En lo que a academias respecta la abundancia de materiales hace muy difícil el trabajo, invitando a no rebasar lo descriptivo o a quedarse en categorizaciones genéricas, que condicionan además la desconexión con otros elementos determinantes más allá de lo lingüístico. Todo esto, creemos, después de nuestro estudio, ha llevado a que la cuestión de las academias se tenga por secundaria, a indicar a pie de página, cuando los datos parecen suficientes para inferir que, como el teatro, incluso a unos niveles más estructurales, fue crucial en la articulación de la cultura barroca, como describe Maravall, «primera cultura de masas».

Con todo, se distinguen en el siglo varias etapas en la actividad de las academias e igualmente en la atención suscitada a la crítica. Mientras que las del primer tercio del siglo, entre las cuales estaban aquellas con Cervantes, Lope y Quevedo en nómina, abundantes pero sin muchas actas publicadas, han atraído a los estudiosos, no tanto así las que empiezan a mediados de siglo, tras una década de los cuarenta en blanco, a verterse impresas al público más asiduamente, con otro perfil de participantes: a muy grandes rasgos, del académico escritor se pasa al académico «oficial» (funcionario), afectando directamente a la calidad literaria de los productos. También se termina de asentar el formato, emulador de la estructura burocrática fortalecida: el «presidente» pronunciaba una «oración», casi siempre en verso; el «secretario» leía unas «cedulillas» chistosas o alguna composición similar; se recitaban poesías, que debían casi siempre versar sobre temas prescritos de antemano, así como el metro y otros requisitos; y se concluía con el «vejamen», pieza satírica en la que el «fiscal» zahería a los participantes haciendo burla de faltas físicas y morales [J. Sánchez].

Paradigmático de esta nueva etapa iniciada en los cincuenta es el grupo que se organizó en torno al ricohombre portugués de familia judeoconversa (llamados entonces «marranos») Melchor de Fonseca y Almeida, por ser el último grupo registrado con cierta continuidad y cohesión, dentro de un mismo nivel de educación, poniendo fin a la práctica académica como actividad definitoria de un grupo de escritores; asimismo las circunstancias sociales y las motivaciones personales de este huésped para promover una academia arrojan luz sobre su verdadero espacio. Contamos, aparte de con otros escritos (poemas, dedicatorias...), de siete actas de reuniones convocadas por este personaje, seis de ellas entre los años 1661 y 1663 y una publicada por primera vez en 1654, el *Jardín de Apolo*, que parece ser una antología de encuentros que llevaban celebrando algún tiempo. Para estudiarla hemos tomado su reedición de 1655 por ser más completa, el impreso de la Biblioteca Nacional R/1551, en Madrid, por Julián de Paredes en formato octavo. Llama poderosamente la atención la centralidad del motivo de la sangre en ocho poemas, atravesando también secundariamente el resto del impreso [J. Caro Baroja].

La metodología de investigación incluirá una categorización tipológica de los poemas que presentan el motivo de la sangre, incluyendo los datos relativos a la autoría, el género, la modalidad métrica, las marcas estilísticas. Los resultados se contrastarán con la caracterización del conjunto de la obra y con el perfil de sus autores, así como con las declaraciones incluidas en los elementos paratextuales y en los textos en prosa propios de las academias, como oraciones, cedulillas y vejámenes. Asimismo, se comparará con lo

presentado en el resto de obras de Fonseca y en la propia condición autorial del mismo, a partir de su voluntad de ascenso desde la periferia (Portugal, el oficio de escritor), al centro (los círculos nobiliarios de la corte madrileña). Como puntos de apoyo esenciales partiremos de la específica pervivencia de la sociedad estamental en España según Maravall, la de un imaginario metafórico asociado a ella según Rodríguez de la Flor y la idea de historicidad desarrollada Juan Carlos Rodríguez. Todo orientado a establecer el valor significativo del motivo de la sangre y sus relaciones con el modelo poético y el discurso aristocrático, con la academia como elemento aglutinador. A nuestro objeto creemos importante desechar los puntos de vista que Caro Baroja llama «intelectuales», del tipo que llevan precisamente a separaciones analógico-temáticas, llegando, con Robbins, a que no es poesía amorosa, o satírica, o burlesca, la que tratamos, y a que sería más correcto hablar de «literatura académica».

Pero partiendo de la premisa de que la literatura es materialización del inconsciente ideológico histórico el análisis resultante parece guardar más coherencia. Bajo el feudalismo cualquiera se consideraría a sí mismo como *siervo* o *señor*, y siempre todos *siervos* de un *Señor*, sin embargo con la aparición de unas relaciones sociales nuevas a partir del cambio de las condiciones históricas regidas por el primer mercado capitalista dichas nociones se alteran, ya que para que sean efectivas hace falta que un *sujeto sea libre para comprar y vender* su fuerza de trabajo, algo que desde luego es imposible para un *siervo*. La aparición del *yo* perfila un *tú* y hace posible el diálogo con alguien presente o ausente, con el ojo o el oído de alguien, se asume un *otro* diferente: un espacio público y otro privado [J. C. Rodríguez].

La matriz ideológica feudal segregaba, así, una ideología *sustancialista-organicista*. El mundo era el gran libro de Dios y cada cosa era signo del orden circular, de la causa Primera, y sólo tenía sentido en tanto que cumplía esa función sintomática asignada por Dios. Pero poco a poco ideas espiritualistas, por un lado, van abriendo brechas en tal sistema, el *franciscanismo-agustinismo* y por otro la idea de *virtud cortesano-caballeresca*. Pero el verdadero cambio es la aparición del primer prototipo de sujeto, el *yo*, nutrido en estas brechas, pero opuesto radicalmente al núcleo puro feudal: lo que llamamos *animismo*, la base de la primera ideología burguesa. Este animismo en su vertiente laica se constituye como *neoplatonismo*. Básicamente dicho pensamiento reconcilia la forma con la esencia (en oposición pero unidas en el sustancialismo), el mundo tiene un alma común, una unidad hermosa que se refleja, dignificándola así, en la materia y que se puede captar. Dentro de este esquema cualquiera, pues, puede ser un *alma bella, el eje de su dialéctica productiva,* mientras que en el sustancialismo no cualquiera tiene la misma *sangre*. La *jerarquía de almas* sustituye a la de *sangres*. Frente a la escritura de Dios, de santos o de nobles, de la escritura-Libro, con el *yo* y su ámbito privado y el público surge el diálogo y la poesía lírica, siendo el soneto el cauce de expresión, representación física, por excelencia del ámbito de lo íntimo, en tanto con sus reglas estrictas su brevedad, su aprisionamiento, se plasmaba como intento de materializar la idea desnuda libre de los elementos superfluos [J. C. Rodríguez].

El hecho es que hay unos nuevos privilegiados, nacidos de la estructura burguesa, cuya posición debe justificarse, y un público con estados de conciencia cada vez más despiertos. Decimos que el mismo mecanismo de pensamiento inductivista está detrás de la nueva justificación de la exclusión: la *sacralidad*, el *magismo*, el *secreto*, la *ciencia*. Si para sociedades religiosas como la feudal donde el aspecto religioso-ideológico es el dominante la jerarquización se justifica en el orden divino, en una configuración que obedece a unos desconocidos designios de la divinidad que no obstante deben respetarse, revestidos de cripticismo, valiéndose del temor ante el espacio desconocido detrás del símbolo, en el

absolutismo esta sacralización se hace descender sobre la *letra*. Así pueden constituirse las academias, creciendo en número a lo largo del XVII, serán centro de la elaboración y nueva estratificación: el *vulgo* y los *discretos*, en tanto que estos últimos poseen la técnica del lenguaje, en concreto impuesto desde la *agudeza incompleja* [F. Rodríguez de la Flor].

En la transición de un primer mercantilismo a la etapa clásica del capitalismo, con el alzamiento de los poderes nobiliarios y su intento de volver a su antiguo esquema jerárquico basado en la sangre, es ésta la que surge como signo explícito, junto a vocabulario que refiere violencia y desgarro, dando cuenta de la lucha social del momento: una vez pacificada la sociedad internamente aflora como tensión en otros niveles y en el cultural qué mejor que la sangre, cuando el pueblo vivía a diario con la imposición *literal* de su limpieza [J. A. Maravall y F. Torres González]. La poesía domina, así, la academia, como vía más apropiada para el cultivo de una superficialidad planificada: para la apropiación de imágenes de la matriz animista, para la destrucción o anulación de su contenido petrarquista, mediante una práctica poética que algunos engloban con el nombre de antipetrarquismo. Desprovista, pues, la poesía petrarquista de su fondo originario, con fines de legitimación, el juego queda en una práctica del dominio de la parodia de sus moldes, a partir de unas normas dadas y el formato rígido de la academia, que dificulta el desarrollo de la libre inventiva y permite que escritores no muy brillantes, letrados, burócratas y nobles, puedan salvar gracias al manejo de esos códigos los papeles, en perjuicio del nivel literario, que baja radicalmente: empieza la institucionalización/desnaturalización de la cultura [J. Robbins].

La tematización mecanicista del animismo reducía los signos del mundo escolástico a materia cuantificable, pero en el seno animista tenía tal reducción un complemento humanista de crítica, de valoración en el marco vital. Sin este marco la reducción de la vida al mundo sensible lleva a conceptualizaciones del mundo parciales como las del inductivismo escolástico: un ojo, un microscopio o un telescopio, que no atisban el conjunto de la materia, tan sólo su detalle y pequeñez. Así veremos en las academias una multitud de temas y tópicos que atienden al horizonte ideológico organicista y al nuevo capitalista de la segunda fase, resultando: la banalización y caricatura de la materia (a fin de resaltar nuestra contingencia, en función del sustancialismo; pero también, aprovechando la idea de la encarnación, de que cuerpo y alma son inseparables, identificar lo humano con lo material, con algo que puede ser *cuantificado* -barajando ya términos del mecanicismo-, controlado por este segundo horizonte y reducido en su existencia a las relaciones capitalistas economicistas).

En último término este último productor economicista culminará en la sustitución en el siglo XVIII en Francia del alma por la razón, del *yo* literal por el *yo* cartesiano, *cogito ergo sum*, que condujo al sujeto del XVIII y el XIX y a la crítica moral pequeño burguesa (Kant, Rousseau y Hegel) de la que no podemos desprendemos hoy. La autosustancialidad de la técnica se traslada al *sujeto*, al intelectual-sujeto, que ejerce una personal valoración ahistórica del mundo reconocida oficialmente de validez universal. Dijo de pasada W. F. King que las academias tenían «mucho que ver con la evolución de estándares críticos actuales». No sólo tiene mucho que ver, están en la médula histórica de nuestras confusiones y errores críticos sobre la historia, la literatura, nuestro presente en definitiva [W. F. King].

Bibliografía

[1] M. Avilés, *Sueños ficticios y lucha ideológica en el Siglo de Oro*, Madrid, Editora Nacional, 1981.
[2] J. Caro Baroja, «La sociedad criptojudía en la corte de Felipe IV», *Inquisición, brujería y criptojudaísmo*, Ariel, Barcelona, 1974, pp. 13-165.

[3] W. F. King, *Prosa, novelística y academias literarias en el siglo XVII*, Madrid, Imprenta Silverio Aguirre Torre, Anejos del Boletín de la RAE, 1963, X.
[4] J. A. Maravall, *La oposición política bajos los Austrias*, Barcelona, Ariel, 1974.
[5] J. Robbins, *Love poetry of the literary academies in the reigns of Philip IV and Charles II*, London, Tamesis, 1997.

[6] F. Rodríguez de la Flor, *Pasiones frías. Secreto y disimulación en el Barroco hispano*, Madrid, Marcial Pons Historia, 2005.

[7] J. C. Rodríguez, *Teoría e historia de la producción ideológica: las primeras literaturas burguesas (siglo XVI)*, Madrid, Akal, 1990.

[8] J. Sánchez, *Academias literarias del Siglo de Oro español*, Madrid, Gredos, 1961.

[9] E. Soria Mesa, *La nobleza en la España moderna. Cambio y continuidad*, Madrid, Marcial Pons Historia, 2007.

[10] F. Torres González, «La medicina española en tiempos de Cervantes», *Cuadernos de estudios manchegos*, 29, 2005, pp. 219-254.

Capítulo 7. Wortbildung, Funktionsverbgefügen y traducción en contextos especializados: vitivinicultura

Isidoro Ramírez Almansa

Dirección: Dra. M. del Carmen Balbuena Torezano

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Traducción e Interpretación, Lenguas Romances, Estudios Semíticos y Documentación

Plaza Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail: isidororaal@gmail.com

Resumen

Este trabajo se centra en el estudio de la terminología vitivinícola en el par de lenguas alemán-español, en tanto que se trata de un léxico especializado. Partimos de la hipótesis de que el conocimiento de las estructuras gramaticales en lengua alemana, así como las estructuras con verbo de función, proporcionan al traductor herramientas que le permiten encontrar la equivalencia adecuada para la correcta traducción de los términos. Para ello, en la primera parte del trabajo establecemos fundamentos teóricos sobre la formación de palabras y las estructuras con verbo de función y presentamos un corpus léxico, que será analizado desde el punto de vista traductológico. Finalmente, en función de los resultados, estableceremos las oportunas conclusiones.

Fundamentos

El sector vitivinícola en España es uno de los campos de la traducción menos tratados desde el punto de vista terminológico. En efecto, y a pesar de su importancia en cuanto a la actividad económica, pocos son los estudios contrastivos que encontramos en torno a la terminología propia del sector en lengua alemana y española. Por ello, este estudio abordará el análisis del léxico propio de la vinificación la producción vitivinícola, a partir de una serie de términos que encontramos representativos.

Hipótesis de partida

Partimos de la siguiente hipótesis: "El conocimiento de los sistemas de producción léxica mediante la derivación y la composición de palabras en lengua alemana posibilita al traductor de textos encontrar la equivalencia en el texto de llegada, aún cuando no disponga de diccionarios o bases de datos terminológicas bilingües especializados".

Objetivos del estudio

Son objetivos del presente estudio:

1. Profundizar en el conocimiento de los procedimientos de formación de palabras en lengua alemana mediante la derivación (*Derivation*, *Ableitung*) y la composición (*Komposition*, *Zusammensetzung*). Así mismo, se llevará a cabo un estudio, en la medida de lo posible, acerca de los *Funktionsverbgefüge*, o construcciones con verbos de función, si bien el número de estructuras gramaticales de esta última categoría suponemos que será muy inferior.

2. Analizar la terminología propia del sector vitivinícola en lengua alemana, a partir de un corpus léxico determinado, haciendo especial hincapié en los procedimientos de formación léxica que intervienen en la creación de dichos términos, y establecer su equivalencia en español.

Metodología

Para alcanzar los objetivos propuestos, el trabajo se estructura en las siguientes partes:

1. La primera parte del trabajo, de carácter eminentemente teórico, contiene un primer epígrafe dedicado a los procedimientos de formación en lengua alemana, desde un punto de vista general. Le sigue un segundo epígrafe en el que se desarrolla de forma más detallada la creación de términos mediante un procedimiento de derivación, con especial atención a la derivación verbal, nominal y adjetiva. Finalmente, el tercer epígrafe aborda la formación de palabras mediante composición, dentro del cual contemplamos la composición determinativa y la composición copulativa como principales procedimientos de formación de palabras.

2. Una segunda parte del trabajo, de carácter práctico, contiene el análisis de términos, que conforman el corpus léxico que trataremos en este estudio. Finalizaremos el trabajo con la exposición de las conclusiones oportunas, a tenor de los resultados obtenidos, y siguiendo lo expuesto en la hipótesis de partida.

Como muestra ofrecemos una ficha terminológica que responde a los fundamentos teóricos de los cuales parte este estudio. Se han analizado un total de 85 términos. Cada una de las fichas contiene las siguientes partes: (1) Término en la lengua original (LO); (2) Tipo de formación: en este campo se describe el procedimiento de formación del término (derivación,

composición); (3) Morfemas fundamentales: se establecen los morfemas fundamentales del término; (4) Morfemas ligados de formación: si existen, se establecen los morfemas ligados de formación; (5) Contexto en lengua alemana (DE): breve extracto en el que podemos encontrar el término. En ese apartado también señalamos la fuente de la cual ha sido tomado el contexto; (6) Comentario aplicado a la traducción, que desde el punto de vista terminológico y traductológico establecerá las principales cuestiones para encontrar la equivalencia del término; (7) Propuesta de equivalencia: se propone la traducción del término en la lengua de llegada; (8) Contexto en español (Traducción): Propuesta de traducción del contexto alemán realizada tras el análisis aplicado a la traducción.

Tabla 1. Beerenauslese (sust. fem.)

Morfemas fundamentales	/beere/ + /auslese/
Morfema de unión	/n/
Contexto DE	1) 1,8 g/l (30 meq/l), ausgedrückt als Essigsäure, bei Qualitätsweinen b.A., die die Bezeichnung „Eiswein“ oder „Beerenauslese“ führen dürfen; Fuente:Eur-lex, **http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2003:0377:FIN:DE:PDF** [Consulta: 11/05/2016].
Comentario aplicado a la traducción	Desde el punto de vista semántico, se trata de una composición nominal que no tiene una equivalencia exacta en la LM, por lo que no es posible la traducción literal de la palabra. Desde el punto de vista morfosintáctico, la expresión resultante en la LM no es un sustantivo sino que es un grupo nominal (vino de vendimia seleccionada). También es destacable que se trata de una palabra que ha sufrido más de un proceso de formación, ya que uno de los morfemas fundamentales /auslese/ ha sufrido un proceso de derivación nominal de tipo deverbal: /auslesen/ → *Auslese*. A este proceso hay que sumar que la palabra de partida en la anterior derivación había sufrido un proceso de composición verbal de tipo deverbal: /aus/ + /lesen/ →*Auslesen.*
Propuesta de equivalencia terminológica	Vino de vendimia seleccionada
Contexto ES (Traducción)	1) 1,8 g/l (30 meq/l) que se manifiesta con la presencia de ácido acético, y que se encuentra en los vinos de calidad con denominación de origen a los que corresponde la designación «Eiswein», o vino dulce de uvas congeladas y «vino de vendimia seleccionada»;

Resultados

Como resultado hemos encontrado, a partir de textos especializados en enología y revistas especializadas en torno al vino, un total de 85 términos cuyo análisis es posible en función de los parámetros establecidos en la fundamentación teórica de este estudio. Por el contrario, el uso de estructuras con verbos de función es escasísima, por no decir nula, dado que existen

verbos simples que responden a todas y cada una de las actividades propias de la viticultura, la producción vitícola, y la comercialización del vino.

Conclusiones

A tenor de los resultados obtenidos podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. Los procesos de formación de palabras en alemán contribuyen a aumentar la productividad de la lengua alemana, pues a partir de un morfema fundamental es posible formar nuevas palabras. Sirva como ejemplo el término *Wein* y todos sus compuestos: *Rotwein, Weisswein, Eiswein.*

2. Esta productividad permite al traductor, conociendo en profundidad los mecanismos y estructuras del alemán, acercarse al significado exacto del término, aún cuando no existan glosarios, bases de datos terminológicas o diccionarios especializados en el par de lengua alemán-español.

3. Este conocimiento de las estructuras léxicas, así como de los mecanismos de derivación o composición, permitirá al traductor "segmentar" los términos y, conceptualmente, tener una idea clara del mensaje en la lengua original, lo que a su vez facilita la labor de traducción a la lengua meta, esto es, el español.

Bibliografía

[1] U. Engel, *Syntax der deutschen Gegenwartssprache.* Erich Schmidt, Berlin. 1982.

[2] J. Erben, *Deutsche Grammatik. Ein Abriß.* Hueber Verlag, München. 1975.

[3] J. Erben, *Einführung in die deutsche Wortbildungslehre.* Erich Schmidt Verlag, Berlin. 2006.

[4] W. Fleischer. B. Irmhild, *Wortbildung der deutschen Gegenwartssprache.* Max Niemayer Verlag, Tübingen. 2012.

[5] H. R. Fluck, *Fachsprachen. Einführung und Bibliographie.* Francke Verlag, Tübingen & Basel. 1996.

[6] M. Lohde, *Wortbildung des modernen Deutschen: Ein Lehrer- und Übungsbuch.* Narr-Francke Verlag, Tübingen. 2006.

[7] R. López-Campos Bodineau, *Morfosintaxis alemana.* Herder, Barcelona. 2004.

[8] W. Motsch, *Deutsche Wortbildung in Grundzügen*. Walter de Gruyter, Berlin. 2004.

Capítulo 8. Nuevo observatorio para un nuevo modelo turístico

Juan Miguel de la Rosa Luque
Dirección Beca: José María Manjavacas Ruiz

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Ciencias Sociales y Humanidades.

Plaza del Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail: jmmanjavacas@uco.es

Resumen

La declaración de la Festividad de los Patios como Patrimonio Inmaterial de la Humanidad y otras acciones anteriores vinculadas a la cultura han convertido a Córdoba en destino turístico preferente. Al mismo tiempo, la crisis económica ha generado en la ciudad un grave debilitamiento de la mayor parte de los sectores productivos y un alto desempleo.

La unión de ambos factores explica la importancia adquirida por el turismo como principal motor económico y su consideración en amplios sectores de nuestra sociedad como recurso imprescindible para superar la difícil coyuntura y un punto de referencia hacia el que orientar los planes futuros de la ciudad.

Esta situación conlleva ineludiblemente un complejo proceso de adaptaciones y cambios que conviene analizar y valorar. Y ante las graves carencias que presenta nuestra ciudad a la hora de afrontar estos procesos surge la propuesta que encarna este trabajo y que tiene por objeto el diseño y desarrollo de un observatorio turístico.

Una herramienta de análisis y control que genere conocimiento riguroso y útil inspirado en los principios de sostenibilidad y bienestar social, que ponga las bases de un nuevo modelo turístico y que esté destinado tanto a profesionales como a otros sectores directa e indirectamente involucrados en la actividad.

Fundamento y conclusiones

España, como uno de los países protagonistas del mercado turístico mundial es objeto de gran interés para quien aspira al conocimiento de las manifestaciones y tendencias que vienen tomando forma en la vanguardia del turismo.

En el marco de una crisis económica que ha mermado gravemente su tejido productivo y su mercado de trabajo, la ciudad de Córdoba ha encontrado su tabla de salvación en la fuerte expansión turística de España en los últimos años [9,1]. Un impulso que se fundamenta en la propia crisis internacional, pero también en otros factores como la inestabilidad sociopolítica de algunos destinos competidores y en una bajada del precio del petróleo que ha abaratado costes de modo significativo, por ejemplo, el precio del billete de avión, un 5,8% en 2015, según la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA).

Dichos factores comparten unas características que conviene recordar: su procedencia externa, su provisionalidad y, en consecuencia, la gran dificultad para predecir su duración y su intensidad. Por tanto, la artificialidad del éxito reciente de la ciudad de Córdoba no se explica solamente apelando a los factores que hemos mencionado. Una mirada atenta sobre la trayectoria seguida por el turismo cordobés durante las últimas décadas desvela que salvo el crecimiento de dotaciones y del número de visitantes a Córdoba su oferta turística, cualitativamente considerada, continúa proponiendo lo mismo o, mejor dicho, más de lo mismo. Carecemos de un producto que, como dice Muñoz de Escalona, [3,1] pueda ser identificado no en función de las características psicosociales de su consumidor sino de sus propias características.

Cabe a mi entender la posibilidad de lanzar una propuesta alternativa que edifique un modelo nuevo con entidad propia, caracterizado por su servicio a los intereses de la ciudad. En términos más concretos, se propone un modelo representativo de un enfoque de oferta que abra la puerta a una iniciativa mercantil que amparada por un amplio compromiso público-privado emprenda proyectos destinados a la organización de bienes y servicios locales en planes de viaje que tengan por objeto la ciudad de Córdoba. Esta propuesta puede suponer un cambio sustancial en el panorama local pues, entre otras cosas, rebajaría el excesivo protagonismo de ciertos sectores como el de la hostelería que el nuevo enfoque denomina "para-turísticos o facilitadores de la actividad" en pro de un sector productor, aglutinador y específicamente turístico que podría ser conocido como "Turoperativo de Recepción".

Pero poner en marcha esta iniciativa es tarea de mucha dificultad que obliga a vencer algunas realidades que forman parte del paisaje y el clima turístico de la ciudad. Realidades que atañen especialmente al comportamiento y a las relaciones que sostienen los actores involucrados.

Durante la celebración de las III Jornadas Etnocórdoba 2016, organizadas por la unidad de investigación ETNOCÓRDOBA Estudios Socioculturales y enfocadas a dilucidar la situación turística de la ciudad, tuve la oportunidad de presentar un estudio, compartido con el profesor del área de Economía Aplicada de la UCO, Don Fernando J. Lara de Vicente, titulado "Turismo: Córdoba en el Vértice". En este documento, sensibles a la situación de tránsito turístico que vivimos, se hacía un vuelo fotográfico por el contexto actual con objeto de capturar dichas realidades desde una perspectiva crítica y distinguir los principales parámetros de su oferta, los cuales fueron posteriormente analizados y desgranados sus puntos más controvertidos. Paso a resumir sus contenidos y a añadir algunos datos estadísticos de interés.

- Falta de investigación sobre turismo a nivel local

- Precariedad formativa y laboral
- Desconexión entre la provincia y la capital
- Concepto muy limitado de oferta Turística
- Falta de consenso entre sus principales actores

Sobre el papel, una de las plataformas a escala local mejor dotadas para abordar el análisis y la investigación turística bajo los parámetros y enfoques actuales, es el Observatorio Turístico. Sin embargo, durante el periodo de tiempo que ha ocupado esta investigación, los documentos encontrados sobre el tema no han proporcionado contenidos en los que pueda apreciarse una definición clara y consensuada sobre qué es un observatorio turístico.

Unos autores ofrecen definiciones excesivamente amplias: la O.T. como herramienta de inteligencia turística estable, que trata de observar la realidad, analizar la dinámica y proveer los resultados a los agentes de un destino [1]. Otros autores, lo conciben como la herramienta de instituciones directamente vinculadas a la planificación económica y territorial del entorno en el que se desarrolla la actividad turística [6].

Para otros autores, como el profesor Jafar Jafari, el O.T. ha de adoptar una posición netamente anticipadora que prevenga situaciones, que recree y planifique nuevos escenarios. Así mismo, debe contar con una base asociativa que incluya la representación del sector público y privado: empresas, instituciones gubernamentales, instituciones académicas, asociaciones ciudadanas, etc. [5,1] cuyo objetivo es interactuar en la sociedad en que se desarrolla, creando hipótesis alternativas y diseñando los planes correspondientes [5,2].

Quizás, en un elemento tan potente y versátil como el observatorio turístico, se pueda encontrar el mejor indicador para calibrar cuál es la capacidad y madurez de un destino y de la sociedad que lo sustenta.

A través de este estudio, que representa un primer avance sobre el tema, se percibe en las O.Ts una política continuista en su gestión, ofreciendo servicios que sólo satisfacen a una misma parte de todo el mercado potencial que un observatorio puede abarcar.

Por otra parte, la desaparición del Consorcio de Turismo ha dejado bajo mínimos la actividad de su observatorio, cuya única actividad consiste en recopilar datos de plataformas estadísticas regionales y nacionales. Esta circunstancia pone de manifiesto el desinterés y falta de compromiso con los que las entidades públicas y empresariales del sector afrontan todo lo que se refiere al conocimiento riguroso de la realidad local. Llegamos a la conclusión que aquello que sabemos de Córdoba, de su dinámica y evolución turística, tan sólo son impresiones más o menos compartidas, desprovistas de análisis y valoración científica. No contamos con una actividad investigadora mantenida en el tiempo, comprometida con la rigurosidad científica de sus resultados que garantice la eficacia de nuestras inversiones y proyectos. Pues son muchas las pruebas del derroche económico y humano empleado en llevar a cabo iniciativas turísticas que carecen de la más mínima utilidad.

En la estructura de los observatorios se echa en falta departamentos comerciales que apuesten por la viabilidad económica del observatorio, que transmitan la utilidad y el valor de sus servicios a una demanda propicia, es decir, a entidades públicas y privadas que aguardan la oportunidad de invertir en valores útiles, creativos, profesionales y responsables con su entorno. En este aspecto, tanto la actualización tecnológica de los observatorios, en sus

soportes y sistemas como la del contexto en el que opera son fundamentales para empezar a confeccionar una red de captación y análisis capaz de abarcar una cantidad ingente y diversa de datos en tiempo real.

En coherencia, el carácter multidisciplinar que debe presidir los nuevos observatorios ha de estar vinculado a instituciones que operan bajo la misma dinámica dotadas de personal experto en el uso de metodologías científicas que aporten la profundidad y objetividad que este trabajo requiere. Y hoy por hoy, es *la universidad* la posición óptima desde la que los O.T. pueden ejercer sus funciones con eficiencia y utilidad al tiempo que prepara a los futuros protagonistas del sector mediante su labor académica y formativa.

El contenido de nuestra comunicación parte de una percepción y valoración del sector turístico de Córdoba desde la perspectiva académica e investigadora de su autor. Y busca sus referencias en los datos ofrecidos por distintas fuentes bibliográficas; en noticias de acontecimientos locales recogidos en prensa, en artículos de revistas científicas especializadas; en entrevista a personajes claves del mundo turístico local y en otros trabajos realizados con motivo de eventos congresuales y de mi actividad como alumno universitario.

Bibliografía

[1] Blasco Franch, D; Cuevas Contreras, Tomás: Observatorio en Turismo: organismo inteligente para la toma de decisiones en destino, Revista Iberoamericana de Turismo, Vol. 3, n.2., Penedo (Brasil), 2013, p. 25-34

[2] Tamames, Ramón; Lázaro Carreter, F; Gallego S.: Diccionario de economía y finanzas. Alianza Editorial, 13 ed. 2006.

[3] Muñoz de Escalona, F: Un sector productivo: el sector turístico. Papers de Turisme, nº 3, 1990, p. 5-17

[4] Muñoz de Escalona, F: La objetivación unívoca del turismo, meta insoslayable del proceso de cientificación. Revista: Estudios Turísticos, nº 171, 2007, p. 7-56

[5] Jafar Jafari: El Turismo como Disciplina Científica. Política y Sociedad. Vol. 42 Núm. 1, 2005, p. 39-56.

[6] Santágata, Hernán G.: La importancia de un observatorio turístico en provincia de Buenos Aires como instrumento de orientación en la toma de decisiones y en la planificación. Facultad de Ciencias Económicas. Universidad Nal. de la Plana, Argentina, 2010, p.10-11.

[7] Jiménez de Madariaga, C.; Hurtado Sánchez, J.**:** Andalucía: Identidades culturales y dinámicas sociales, Aconcagua Libros, Sevilla, 2012, p. 142.

[8] Primo Jurado, Juan J: Antonio Cruz Conde y Córdoba: Memoria de una Gestión Pública (1951-1967). Ayuntamiento de Córdoba, Córdoba, 2005, p. 27.

[9] Lara de Vicente, F.J.; Manjavacas Ruiz, J.M.; De la Rosa Luque, J.M.: Documento de Trabajo de la unidad de investigación de la UCO, ETNOCORDOBA, Estudios Socioculturales, Córdoba, 2016, p. 1-8.

Capítulo 9. Transmisión e intercambios del saber científico en la Edad Media: Desarrollo y estudio de las ciencias al margen o ars notaria en los siglos XII y XIII

Patricia Téllez Francisco

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Ciencias Sociales y Humanidades (Área de Filosofía).

Plaza del Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail: ptellez94@gmail.com

Resumen

La Edad Media desempeña un papel importante en el proceso de transformación de las ciencias de la Antigüedad, gracias a la labor de traducciones de todo el material textual que llegaría a nuestro continente en árabe, hebreo y griego. Algunas de las ciencias tradicionales, en casos particulares, se encuentran conectadas con el desarrollo extra académico de las artes adivinatorias. El siguiente proyecto estudia la actividad desarrollada en algunos de los centros de actividad intelectual y científica. Además, analiza la evolución de este proceso desde los núcleos de traducción e interpretación y su incidencia en los *estudios generales* y las futuras universidades.

Fundamento, Metodología, Resultados y Conclusiones

El proceso de transmisión e intercambio de la cultura y el conocimiento en la Edad Media, es una de las líneas de investigación actualmente en auge. La llegada del conjunto de nuevos saberes desde Oriente a Occidente, especialmente durante los siglos XII y XIII, contribuye a la construcción de una metodología científica que alcanza los albores de la Modernidad.

Para ello, el estudio de los puntos de recepción e intercambio se lleva a cabo gracias al establecimiento de dos líneas: una horizontal a lo largo de la cuenca del Mediterráneo, y, a su vez, una serie de líneas verticales Norte-Sur que describen las relaciones intelectuales de distinta procedencia. De esta premisa parte la metodología del trabajo, así como la selección de fuentes para la elaboración de una idea general del contexto intelectual, además de un acercamiento a la alquimia, las artes adivinatorias y la astrología. El esquema de trabajo concluye con la elaboración de hipótesis que dan respuesta a las interrogantes principales de la investigación.

El punto de partida, se localizó en Oriente, hacia la segunda mitad del siglo VIII d.C., donde la labor de las traducciones constituyó empresa esencial ante la toma de contacto del Islam con otras culturas e ideologías religiosas [1]. Dicha labor alcanzaría un carácter específico, albergaría unos patrocinadores determinados y seguiría unas vías de intercambio a medida que los movimientos migratorios y expansivos fueran sucediendo [2]. De esta forma, las penínsulas Itálica e Ibérica – en puntos como Sicilia, Montecassino, o las zonas del valle del Ebro y Toledo – se constituyen como lugares desde los cuales el saber oriental efectúa su entrada en el Occidente Latino [3]. Con su llegada, fragua un nuevo contexto intelectual protagonizado por el desarrollo de las ciencias experimentales. Serán numerosos los desplazamientos de intelectuales como Adelardo de Bath, Hermann de Corintia, Robert de Ketton a los centros de recepción. Asistiríamos, así pues, a una internacionalización del saber entre los siglos XII y XIII [4].

Sin embargo, algunos saberes que sí estaban bien arraigados en la tradición oriental como la alquimia, las artes adivinatorias y la astrología, encuentran una difícil acogida en torno a las artes liberales del *trivium* y el *quadrivium* [5]. No obstante, analizando las clasificaciones que se desarrollan ante la llegada del conjunto de nuevos saberes, como la realizada por Domingo de Gundisalvo, en el siglo XII, se aprecia una convivencia de las ciencias tradicionales y las nuevas [6]. Es decir, la astrología, la nigromancia o la alquimia, encontraban un lugar de relevancia junto a saberes como la medicina. Una tendencia que se intuye incluso con anterioridad. Según la obra escogida para este trabajo, el *Ghayat al-Hakim* o *Picatrix*, que recogía todo un conjunto de conocimientos astrológicos y mágicos pertenecientes al siglo IX, sufre constantes adiciones durante los siglos posteriores. El tratado *Flos Naturarum* – estudiado por el Profesor David Pingree – añadido a la versión latina del *Picatrix*, a finales de la primera mitad del siglo XV, muestra un lenguaje alquímico y una simbología mágica para el estudio de la medicina. Hablaríamos de un aporte mutuo, un desarrollo continuo que no se efectúa en el ámbito académico de las universidades de Bolonia, París u Oxford.

Las hipótesis finales que propone la investigación, se construyen en torno a varias interrogantes: ¿Cómo es posible que, en los centros académicos, no figure el estudio de dichas ciencias, pero sí se incluyan en las distintas clasificaciones? ¿A qué se debe que a finales del siglo XIV, se funden Universidades en Europa del Este especializadas en tales ciencias? Las propuestas llevadas a cabo se resumen en dos ideas principales: en primer lugar, la distinción entre conceptos de ciencias y artes subordinadas, reduciendo su relevancia de estudio; en segundo lugar, dos contextos europeos distintos, donde las universidades de Europa

Occidental surgían como una progresiva transformación que partía del ámbito eclesiástico; y, en el caso de Europa Oriental, promovidas por parte de las cortes reales, que albergaban propósitos intelectuales y prácticos determinados.

En cualquier caso, su continuidad es demostrable en las labores de intelectuales posteriores como Copérnico, Kepler, Galileo Galilei o Newton. Alquimia, astrología y las artes adivinatorias, serían la base para el establecimiento de una metodología científica moderna que tiene sus raíces en la Edad Media.

Bibliografía

[1] D. Gutas, Greek Thought, Arabic culture: The Graeco- Arabic translation movement in Baghdad and Early Abbasid Society (2 and – 4th/ 8th-10th centuries), New York, 1999, p. 121-135.

[2] S. Bulbut in: D. Freidenreich, M. Goldstein (Eds), Beyond Religious Borders. Interaction and intellectual exchange in the Medieval Islamic world, University of Pennsylvania Press, Philadelphia, 2012 p. 57-65.

[3] C. Burnett, in: D. C. Lindberg, M.H. Shank (Eds), The Cambridge History of Science. vol.2: Medieval Science, Cambridge, 2013, p. 392-408.

[4] P. Mantas, in: P. Mantas, C. Burnett (Eds) Arabica veritas, vol.1, Córdoba, 2014, p. 195-209.

[5] Y. Spencer, *Crossing Boundaries at Medieval University,* Brill, Leiden, 2011, p.18.

[6] J. Cadden, in: D.C. Lindberg, M.H. Shank (Eds), The Cambridge History of Science. Vol. II, Cambridge, 2013, p. 208-244.

Capítulo 10. El Escepticismo como corriente filosófica dominante en la sociedad postmoderna

Celia María Valero Amil

Universidad de Córdoba. Facultad de Filosofía y Letras. Departamento de Ciencias Sociales y Humanidades.

Plaza del Cardenal Salazar, 3, 14071-Córdoba. E-mail:L12vaamc@uco.es

Resumen

El Escepticismo es uno de los movimientos filosóficos más antiguos, algunos autores remiten al propio Homero para su fundación. De hecho, parece que la duda está inmersa en el ADN del ser humano, por tanto, pensamiento y duda están unidos. Este movimiento iniciado en la filosofía presocrática y la sofística, ha consolidado actitudes filosóficas que ocasionaron evoluciones del pensamiento humano por las cuales hoy día concebimos el mundo como una búsqueda de respuestas, pero también de preguntas a veces más relevantes.

A pesar de que cada época histórica ha desarrollado una capacidad escéptica, es la sociedad actual la que más se aproxima a los principios del Escepticismo filosófico. Ya sea porque con el nacimiento de las nuevas tecnologías y redes sociales la complejidad de la realidad nos impide simplificarla en una sola, o que la multiplicidad de imágenes por segundo que llegan a nuestro cerebro amplían nuestro espectro de referentes cognitivos, las dudas con las que nos enfrentamos hoy no merman, sino que se amplían y tienen similitud con los retos de aquellos escépticos antiguos cuya sociedad mutó desde los absolutos universales hasta la relatividad subjetiva. La búsqueda de respuestas debería ser, pues, la actitud filosófica de la sociedad actual.

Fundamento

Para concebir el Escepticismo como filosofía influyente en esta sociedad posmoderna y relativista, hemos de articular el entramado que conformó esta corriente de pensamiento empezando por sus inicios en la filosofía presocrática. Autores como Demócrito y sofistas como Protágoras, por sus continuas dudas sobre la posibilidad del conocimiento y la consecución de una verdad intersubjetiva y universal fueron el antecedente directo de lo que se concebiría posteriormente como Escepticismo. Los primeros rastros de este movimiento filosófico podemos encontrarlos en Pirrón de Elís (filósofo griego del 360 a.C.), continuador de la Escuela de Abdera a través de uno de los discípulos de Demócrito, Anaxarco. Este filósofo, ejemplo perfecto de vida y pensamiento escéptico y del que queda constancia sólo por sus discípulos posteriores, ya que es uno de los ágrafos más famosos, debido a su desapego hacia la escritura –muy coherente con lo que es el escepticismo como actitud filosófica de continua búsqueda y huida del dogmatismo debiera ser- nos dará las claves que sustentan el escepticismo posmoderno como actitud presente en la filosofía y el hacer humanismo hoy día. Cierto es que, tras Pirrón, su tradición escéptica fue muy reformulada, tanto por la propia Escuela de Platón que se encargó de elaborar un Escepticismo académico tras la muerte de su creador, como por Enesidemo y Sexto Empírico.

Posteriormente, muchos filósofos han seguido apegados a la tradición pirrónica durante la Edad Media y Moderna, y han sido varias las actitudes escépticas que han llevado a la evolución del conocimiento en un momento en el que, si bien el escepticismo no era ni tan siquiera aceptado como actitud filosófica, sí que su carácter de continua búsqueda del conocimiento y el poner en tela de juicio todo aquello que se nos aparece y se nos muestra como fenómeno, ha estado muy en contra del pensamiento aceptado neoplatónico de ciertas etapas de la historia y, por ende, ha ayudado a consolidar muchos de los conocimientos que tenemos hoy día.

De tal manera, podemos afirmar que, si bien la tradición escéptica pirrónica ha sido existente y rica a lo largo de los siglos, la característica principal de la misma es la duda o actitud inquieta ante la indeterminación de la realidad, que nos llevaría a lo que el pirronismo denominaba *"ataraxia"* [1] -, y, ante ella, una anulación de todo discurso y tranquilidad del ánimo por la imposibilidad de dar absolutos dogmáticos – o *"aphasía"* [2] -. Ello nos conducirá a la obtención de ciertos resultados en esta investigación nuestra, que pretende hallar aquellas actitudes humanísticas y filosóficas actuales que avalen la sentencia firme de que la posmodernidad ha resultado ser la más escéptica de las épocas.

Metodología

Para las presentes investigaciones, la metodología a seguir ha consistido en una búsqueda de bibliografía a través de la cual poder extraer los datos que consoliden la tesis de que la Posmodernidad es una época en la que la actitud escéptica es la más utilizada para hacer filosofía y humanismo hoy día. De tal manera, a lo largo de esta investigación, podemos observar dos caminos diferentes:

- La metodología teórica ha sido, como hemos podido observar, historiográfica y positivista, ya que sin intención de interpretación propia, se ha llevado a cabo una búsqueda documental de aquellas características comunes entre el Escepticismo pirrónico de la Antigüedad y el posmoderno. De tal manera, esos datos han sido expuestos de manera positivista, es decir, para ampliar el conocimiento de manera cuantitativa y específica.

- Por otro lado, la metodología práctica ha consistido en la creación de un nuevo proyecto de investigación denominado "El escepticismo pirrónico empírico y el escepticismo académico en su desarrollo histórico: escepticismo y heterodoxia en la filosofía Medieval y en el Renacimiento" cuya intención es el estudio de la evolución de esta corriente filosófica en la época moderna.

Resultados y conclusiones

Iniciándonos ya en el tema propuesto, no podríamos negar que la posmodernidad se ha aventurado en un radical relativismo cognoscitivo, ya que son las convicciones de pensamiento de esta sociedad actual las que nos llevan a un análisis epistémico de la verdad que implica la no creencia en absolutos, por el contrario, con la aparición de una perspectiva nihilista que conllevó al relativismo de inicios del siglo XX. Ello desencadenó toda una nueva perspectiva hermenéutica, es decir, interpretativa de la realidad, que nos lleva a tener verdaderas disputas filosóficas sobre la objetividad o subjetividad de un presupuesto, tal y como tuvieron aquellos filósofos escépticos de la Antigüedad. Es decir, en palabras del Profesor Ramón Román Alcalá, lo que plantea el escepticismo pirrónico es la dificultad de encontrar *"el vínculo que nos hace pasar de una sensación relativa, subjetiva e individual a la certeza universal y objetiva de que esa sensación es verdadera"* [3].

Ello mismo conectaría con una realidad posmoderna que es continuamente mutante, tanto como para poder asegurar que no existe visión objetiva de las cosas, sino más bien sensaciones líquidas –aquellas del amor, del miedo, de la sociedad, de la vida posmoderna de la que habla Bauman [4] -, de que el fenómeno que se nos muestra es una visión subjetiva de la realidad. No obstante, el escéptico contemporáneo posee una tarea ardua ya que la realidad actual, con la creación de las nuevas tecnologías es cada vez más indeterminada, más performativa y ya incluso el propio ser humano es tan cambiante como imágenes de él mismo haya. Todo hoy día, como defienden las ideas contractuales de Jean Baudrillard, es un simulacro [5], que obliga al ser pensante a adquirir una actitud más escéptica, a buscar más frenéticamente. Ello mismo le llevaría, pues, a la realización de un análisis de la sociedad, a su vez indeterminado y relativo.

De igual manera, Jean François Lyotard, en su libro *La Condición Postmoderna: Informe sobre el saber* [6], insta a que el lenguaje constriñe la realidad a una sola, limitando la multiplicidad de realidades que hay, abogando de nuevo por una inexistencia de lo absoluto o, como él mismo denomina, *"el determinismo"*. Lyotard, por otra parte, demuestra que la multiplicidad de realidades existe remitiéndose a la gran cantidad de culturas coexistentes en el mundo.

En cuanto a todo aquello que envuelve al arte, el concepto de objeto artístico es, igualmente una ilusión, una indeterminación compuesta por tantas interpretaciones como espectadores existan. De tal manera, la estética abandonaría sus valores absolutos para converger en la conciencia de la multiplicidad de hermenéuticas. Esto es lo que ha llevado a ensayistas como Arthur Danto a anunciar taxativamente que *"el arte ha muerto"* [7] - arte entendido como concepto de mímesis tradicional-; Y al filósofo estadounidense Howard Becker a crear el concepto de *"mundos del arte"* [8] -tantos como intérpretes existan-, que deberían ser estudiados, ya no por la estética, sino por la sociología.

Bibliografía

[1] Román, R., El Escepticismo Antiguo: Pirrón y la tradición escéptica griega, Universidad de Córdoba, Córdoba, 1994. 277-289.

[2] Ídem.
[3] Ibídem, 263.
[4] Z. Bauman, Vida líquida, Paidós, Barcelona, 2009.
[5] J. Baudrillard, Cultura y simulacro, editorial Kairós, Barcelona, 2005.
[6] J.F. Lyotard, La condición postmoderna: informe sobre el saber, Cátedra, Madrid, 1998.
[7] A. Danto, Después del fin del arte: el arte contemporáneo y el linde de la historia, Paidós ibérica, Barcelona, 2001.
[8] H. S. Becker, Los mundos del arte: sociología del trabajo artístico, Universidad nacional de Quilmes, Buenos Aires, 2009.

Ciencias de la Salud

Capítulo 11. Marcadores moleculares relacionados con el splicing en la detección y estudio de enfermedades metabólicas

Emilia Mª Alors Pérez

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Dirección: Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Ed. Severo Ochoa (C-6), tercera planta. Campus Universitario de Rabanales. E-mail: b12alpee@uco.es

Resumen

La obesidad es un problema de salud complejo que se relaciona con la aparición de graves comorbilidades y un drástico deterioro del funcionamiento de diversos órganos metabólicos como el hígado. La obesidad altera la homeostasis del organismo, afectando a los patrones de expresión génica de diversos tejidos metabólicos. Dicha alteración está asociada con la expresión aberrante de variantes alternativas de splicing de diversos genes. Concretamente, la desregulación del splicing alternativo normal, proceso que genera varios ARNm a partir del mismo gen, puede influir en el desarrollo/progresión de ciertas patologías. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar el patrón de desregulación de la maquinaria celular que controla el splicing alternativo (componentes del spliceosoma/factores de splicing) en el hígado en respuesta a la obesidad. Para ello, generamos un modelo de ratón obeso inducido por dieta en el que se analizaron dichos parámetros a nivel hepático. Los resultados obtenidos indican una clara desregulación de la maquinaria de splicing en el hígado de ratones obesos, lo que sugiere que la alteración de ciertos componentes de la maquinaria de splicing puede ser responsable de la expresión desregulada de variantes de splicing producidas en tejidos clave bajo condiciones de desbalance metabólico como la obesidad.

Fundamento

La **obesidad** es un grave problema para la salud a nivel mundial que tiene su origen en la combinación entre la predisposición genética del individuo y factores ambientales (fuente: OMS). Su creciente incidencia, junto con la relación existente entre el desarrollo de obesidad y la aparición de diferentes patologías, ha provocado que sea considerada como uno de los **problemas más serios y complejos para la salud a nivel global**. Uno de los órganos más afectados por esta patología es el **hígado**. De hecho, alteraciones en sus funciones pueden conducir a la aparición de hígado graso no alcohólico, una patología que afecta aproximadamente al 30% de la población [1]. Pese a que la obesidad es una enfermedad multifactorial, el componente genético juega un importante papel en su desarrollo. Así, la alteración de la homeostasis del organismo puede deberse a la alteración de los patrones de expresión génicos normales de ciertos tejidos metabólicos [2]. Dicha alteración, en muchos casos, está asociada con la expresión aberrante de variantes alternativas de splicing. En concreto, el splicing alternativo es un proceso que genera varios ARNm a partir del mismo gen, cuya desregulación subyace al desarrollo/progresión de ciertas patologías. Por ello, la desregulación del proceso de splicing alternativo en determinados genes podría contribuir al desarrollo del fenotipo metabólico asociado con la obesidad, a través de la generación de variantes que favorezcan a la acumulación de grasa, la hiperinsulinemia u otras alteraciones metabólicas [3]. En este sentido, es importante mencionar que existen estudios que han demostrado la implicación de ciertos componentes del spliceosoma/factores de splicing en el desarrollo y/o progresión de diferentes patologías (ej. patologías metabólicas) [4,5]. Además, se ha demostrado que determinadas drogas también afectan a esta maquinaria [6]. En concreto, la **metformina,** un fármaco utilizado para tratar la diabetes mellitus tipo 2, parece que puede ejercer parte de sus acciones a través de la modulación del proceso de splicing alternativo [6], provocando la alteración del patrón de expresión de ciertas variantes de splicing en los órganos diana de esta droga.

Por todo lo expuesto, la **hipótesis** de partida del presente trabajo se basa en la idea de que la desregulación de determinados componentes del spliceosoma y factores de splicing podría ser la causa subyacente a la expresión de variantes de splicing aberrantes en determinados tejidos metabólicos clave bajo condiciones de desregulación fisiológica, como la obesidad, y que esta expresión podría ser modulada por el tratamiento con metformina.

Metodología

Para explorar la hipótesis del trabajo, se desarrolló un modelo clásico de ratón obeso inducido por la dieta. En concreto, se usaron 32 ratones macho FVB/N que, con 10 semanas de edad, se separaron en dos grupos, HFD y LFD, alimentados con dietas altas (n=16) y bajas (n=16) en grasa, respectivamente. Para comprobar la efectividad de la dieta HFD en la inducción del estado de obesidad, se realizó un test de tolerancia a la glucosa (GTT) en la semana 22 de dieta. A partir de la semana 28 de dieta, la mitad de animales de cada grupo fueron tratados con metformina [disuelta en agua (250mg/kg/día)] y la otra mitad con vehículo (agua) durante 13 semanas. En ambas fases (pre-/post-metformina), se determinó la ingesta de agua y alimento, y la composición corporal (masa grasa y masa magra) de los animales. Además se midieron los niveles de insulina en plasma. El sacrificio se realizó en la semana 51 de edad por decapitación sin anestesia y se recogieron los hígados de cada uno de los ratones, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80ºC hasta su posterior procesamiento.

En segundo lugar, para llevar a cabo el estudio de la maquinaria de splicing se realizó una búsqueda *in silico* para seleccionar una batería de genes implicados en el proceso de splicing

que pudiesen estar implicados con la aparición y/o desregulación de variantes de splicing asociadas con alteraciones metabólicas inducidas por obesidad. Una vez seleccionados, se llevó a cabo el diseño de cebadores y su posterior validación en el laboratorio, mediante las técnicas de PCR convencional, electroforesis y purificación de ADN, para comprobar que realmente eran específicos y amplificaban los productos para los que habían sido diseñados. Se homogenizó el tejido hepático de los ratones, se extrajo su ARN (método fenol-cloroformo) y se realizó su retrotranscripción. Por último, se midió la maquinaria de splicing mediante un array cuantitativo de PCR, el cual permite obtener un análisis de expresión basado en una tecnología de microfluidos.

Resultados

Desarrollo del modelo de obesidad: Con el objetivo de confirmar el estado de obesidad inducido en los ratones alimentados con una dieta alta en grasa, se estudió la evolución de su peso. Los animales que habían sido alimentados con la dieta alta en grasa aumentaron significativamente su peso después de 17 semanas de dieta. Además, al observar los resultados obtenidos en la GTT, se comprobó que la capacidad de tolerar la sobredosis de glucosa era significativamente menor en los animales HFD. Es decir, estos animales tenían menor capacidad para reducir los niveles de glucosa frente a una sobrecarga, lo que confirma el estado de obesidad y de insulino-resistencia del modelo. Una vez establecido el modelo, se sometieron al tratamiento con metformina (o vehículo) y se observó que la metformina, en los animales alimentados con la dieta baja en grasa, no mostraron diferencias significativas en peso con respecto a los animales no tratados. Además, la diferencia de pesos entre los grupos de animales alimentados con la dieta alta en grasa y baja en grasa también se mantuvo. Sin embargo, los animales HFD tratados con metformina mostraron diferencias significativas en peso con respecto a su control (HFD-agua), revelando un claro efecto de la droga en los mismos. Por otro lado, con el fin de conocer otros parámetros que aseguraran la validación del modelo, se analizó la ingesta de comida y agua antes y después del tratamiento. En general, los resultados obtenidos fueron los esperados. Los animales que habían sido alimentados con una dieta rica en grasa consumían una cantidad de alimento menor (aunque más Kcal totales) que los alimentados con una dieta baja en grasa, además de ingerir menos agua. Los resultados recogidos después del tratamiento (semana 36) corroboran los citados anteriormente. Además, se observó como el tratamiento con metformina disminuye la ingesta de alimentos en el grupo HFD, respecto a HFD-agua. Este hecho, ayuda a certificar que la metformina estaba ejerciendo su efecto en los animales, ya que está comprobado que una de las consecuencias secundarias de su uso en humanos es la disminución en la ingesta de alimentos. Por último, la determinación de la proporción de masa grasa y masa magra de los ratones mediante MRI antes (semana 27) y después (semana 40) del tratamiento reveló que el porcentaje de masa grasa era mayor en los animales alimentados con una dieta alta en grasa antes del tratamiento, mientras que la masa magra era menor. Por último, el análisis de niveles de insulina en el plasma de los ratones, reveló unos menores niveles en los animales LFD con respecto a los HFD y un leve efecto de la metformina.

Estudio de las alteraciones en la maquinaria de splicing: Para seleccionar los genes a estudiar se realizaron diferentes búsquedas bibliográficas, lo que resultó en la identificación de varios factores de splicing de interés por estar relacionados con la señalización de insulina, el metabolismo de la glucosa, el desarrollo de la obesidad e incluso con los efectos de la metformina. Además, puesto que el spliceosoma es una maquinaria muy compleja, se seleccionaron algunos de sus componentes y factores que intervienen en algunos de sus pasos clave. De esta búsqueda resultaron 45 genes que podrían estar involucrados en la

desregulación hepática asociada a la obesidad. Una vez diseñados y validados las parejas de cebadores, se llevó acabo un estudio de sus niveles de expresión en los hígados.

Los resultados revelaron que la expresión de algunos componentes del spliceosoma y factores de splicing estaba alterada en el hígado de los ratones obesos comparados con los controles. Así, se comprobó que la condición de obesidad está asociada a la alteración de la expresión hepática de algunos componentes del spliceosoma mayor, esenciales para el ensamblaje del complejo al pre-ARNm. El hecho de que los cambios más destacados cuando se induce la condición de obesidad sean componentes del spliceosoma podría justificar, al menos en parte, la aparición de proteínas aberrantes en el hígado de este modelo. Por otro lado, algunos de los componentes de la maquinaria de splicing y factores asociados a este proceso estaban sobreexpresados en ratones LFD y bajo el tratamiento con la metformina. La sobreexpresión de estos factores en respuesta a la metformina nos indica que dicha droga puede tener consecuencias a nivel transcripcional, de manera que está alterando proteínas con funciones muy dispares. Sorprendentemente, en general, estos cambios no se reproducen en condiciones de obesidad, lo que puede sugerir que el hígado de los ratones obesos puede ser parcialmente resistente a las alteraciones en la maquinaria de splicing en respuesta a la metformina.

Conclusión

Con respecto al modelo de obesidad, podemos concluir que la metformina es una droga capaz de reducir el incremento de peso inducido por una alimentación basada en una dieta rica en grasa, y mejorar el perfil metabólico de los animales obesos. Del estudio de la maquinaria de splicing, los resultados aquí mostrados refuerzan la idea de que la desregulación de ciertos componentes del spliceosoma y factores de splicing pueden ser responsables de la expresión alterada de un alto número de variantes de splicing que se producen en el hígado en condiciones de obesidad, en ausencia o en presencia del tratamiento con metformina. Además, la sobreexpresión de algunos factores bajo el efecto de la metformina en condiciones de normopeso, puede indicar que el hígado de los ratones obesos puede ser parcialmente resistente a las alteraciones de la maquinaria de splicing en respuesta a la metformina. Nuevos estudios futuros aclararán las posibles implicaciones fisiológicas de estos hallazgos, determinando la conexión existente entre las alteraciones de los factores y moléculas alteradas en la enfermedad, para proporcionar nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

Bibliografía

[1] Noureddin, M. and M.E. Rinella, Nonalcoholic Fatty liver disease, diabetes, obesity, and hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis, 2015. 19(2): p. 361-79.

[2] Bano, G., Glucose homeostasis, obesity and diabetes. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2013. 27(5): p. 715-726.

[3] Pihlajamaki, J., et al, Expression of the splicing factor gene SFRS10 is reduced in human obesity and contributes to enhanced lipogenesis. Cell Metab, 2011. 14(2):p.208-18.

[4] Kaminska, D. and J. Pihlajamaki, Regulation of alternative splicing in obesity and weight loss. Adipocyte, 2013. 2(3): p. 143-7.

[5] Kaminska, D., et al., Regulation of alternative splicing in human obesity loci. Obesity (Silver Spring), 2016.

[6] Laustriat, D., et al., In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. Mol Ther Nucleic Acids, 2015. 4: p. e262.

Capítulo 12. Tratamientos psicológicos basados en la evidencia para trastornos mentales en adultos. Una comparación entre organizaciones internacionales.

Jorge Corpas López[1]

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias de la Educación. Dpto. de Psicología.

Avda. San Alberto Magno s/n. E-mail:jorgecolo55@gmail.com

Resumen

Los tratamientos psicológicos basados en la evidencia científica son en la actualidad la mejor opción para abordar los trastornos mentales en la mayoría de servicios de salud mental de todo el mundo. Este artículo proporciona una revisión crítica acerca de las recomendaciones de intervención de las distintas organizaciones para determinar los niveles de evidencia asociados a su elección. El objetivo de esta investigación ha sido analizar los tratamientos basados en la evidencia extraídos de RCTs, revisiones sistemáticas, metaanálisis, guías y listados proporcionados por el National Institute for Health and Care Excellence (NICE), American Psychological Asociation (APA), Cochrane Collaboration (CC) y the Australian Psychological Society (APS), para trastornos de población adulta. Los resultados indicaron para algunos trastornos (e.g., trastornos de alimentación) una elevada correspondencia entre organizaciones. Sin embargo, para otros (e.g., esquizofrenia) existen importantes discrepancias significativas entre las recomendaciones de cada una de ellas y entre los grados de evidencia de los que informan. Estos resultados promueven la reflexión sobre cuál es el significado que se atribuye a la evidencia científica en lo que respecta a tratamientos psicológicos y señalan importantes limitaciones como la discrepancia en el grado de acuerdo entre organizaciones, la falta de replicabilidad de los estudios y actualización de los listados, así como la amplia variabilidad de las intervenciones.

[1] Este trabajo se ha realizado en coordinación con el profesor Juan Antonio Moriana y Mario Gálvez, dentro del Proyecto de Investigación PSI2014-56368-R del Programa Retos del MINECO.

Fundamento

La psicología científica ha sido una disciplina que pretende legitimar sus teorías mediante investigaciones empíricas que respalden sus resultados. El estudio de la eficacia de diferentes tratamientos psicológicos desde la asunción de que "solo la ciencia puede distinguir las buenas intervenciones de las que no lo son" [1] ha significado uno de los avances más importantes dentro de la psicología clínica. Sin embargo, el impacto de los avances científicos en la práctica clínica y salud pública todavía es muy pequeño [2].

En 1993, la División 12 de la APA (Clínical Psychology) coordinó una comisión sobre la promoción y difusión de procedimientos psicológicos, de la que se derivaron varios informes [3,4,5] que proporcionaron listados de tratamientos con base empírica y que fueron considerados a partir de criterios que incluían la evaluación de Randomized Controlled Trials (RCTs) utilizando grupos control. Comenzaron a desarrollarse criterios para delimitar claramente los Empirically Supported Treatments (EST) para que los seguros sanitarios los incorporaran a los listados de servicios que ofrecían a sus usuarios [6,7,8].

Parece evidente que si se han inventariado más de 250 terapias psicológicas diferentes [9] y más de 400 técnicas y variantes asociadas a éstas [10], plantearse que todas ellas son eficaces puede resultar utópico. Habría que demostrar, desde una perspectiva científica, qué tratamientos son realmente efectivos, también informar de los que no lo son (o no lo han demostrado, de momento) o incluso de los que pudieran ser hasta perjudiciales. Estos planteamientos representan en la actualidad uno de los enfoques más importantes y relevantes del estudio de trastornos mentales dentro de la psicología clínica [2].

Nuestro principal objetivo es analizar y compilar listados de tratamientos psicológicos basados en la evidencia, por trastornos, según la información proporcionada por RCTs, metaanálisis, guías y revisiones sistemáticas del National Institute for Health and Care Excellence (NICE), Cochrane Collaboration (CC), American Psychological Association (APA) and The Australian Psychological Society (APS). A partir de esta información revisamos y comparamos los criterios, grados de evidencia y listados de estas instituciones analizando el nivel de coincidencia entre ellas.

Metodología

Revisión sistemática siguiendo el sistema PRISMA.

Resultados

Existen numerosos tratamientos para buena parte de trastornos (e.g., 23 tratamientos para la depresión), pero no todos ofrecen la misma calidad de la evidencia científica. Por tanto, resulta necesario contribuir a la mejora de la calidad de los RCTs con más estudios independientes que fomenten y consideren la replicabilidad como un criterio mucho más relevante de lo contemplado hasta el momento. Finalmente, respecto a la comparación en sí, hemos comprobado que mientras para algunos trastornos aparece una evidencia muy parecida (e.g., trastornos alimenticios), en otros existen de manera significativa tratamientos de más o de menos en una u otra institución (e.g., depresión), llegando a existir en algunos trastornos preocupantes divergencias respecto a los tratamientos entre instituciones (e.g., esquizofrenia).

En cuanto a lo que respecta a la evidencia científica de tratamientos psicológicos por trastornos podemos determinar que, para el GAD (Trastornos de Ansiedad Generalizada), la

Cognitive Behavioral Therapy (CBT) es el tratamiento de elección con el nivel máximo de coincidencia entre instituciones.

Conclusiones

Esta investigación es la primera que compara la evidencia que cuatro instituciones de referencia internacional otorgan a los diferentes tratamientos psicológicos para cada uno de los trastornos mentales en adultos. Como principales hallazgos hay que destacar que no existe consenso respecto a los criterios de evidencia de tratamientos psicológicos para trastornos mentales en población adulta y que las terapias basadas en modelos cognitivo-conductuales son las que han demostrado mayores niveles de evidencia

Bibliografía

[1] Westen D, Novotny MC, Thompson-Brenner H. The Empirical Status of Empirically Supported Psychotherapies: Assumptions, Findings, and Reporting in Controlled Clinical Trials. Psychol. Bull. 2004; 631-663.

[2] Barlow DH, Bullis JR, Comer JS, Ametaj AA. Evidence-Based Psychological Treatments: An Update and a Way Forward. Annu. Rev. Clin Psychol. 2013; 9, 1-27.

[3] Chambless D, Hollon S. Defining empirically-supported therapies. J Consult. Clin. Psychol. 1998; 66, 7-18.

[4] Chambless D, Ollendick T. Empirically Supported Psychological Interventions: Controversies and Evidence. Annu. Rev Psychol. 2001; 52, 685-716.

[5] Woody SR, Weisz J, McLean C. Empirically Supported Treatments: 10 Years Later. The Clinical Psychologist. 2005; 58, 5-11.

[6] Barlow DH. Health Care Policy, Psychotherapy Research, and the Future of Psychotherapy. Am. Psychol. 1996; 51, 1050-1058.

[7] Seligman MEP. The effectiveness of psychotherapy. The Consumer Reports Study. Am. Psychol. 1995; 50, 965-974.

[8] Shapiro DA. "Validated" treatments and evidence-based psychological services. Clin Psychol-Sci Pr. 1996; 3, 256-259.

[9] Herink R. The psychotherapy handbook: the A to Z guide to more than 250 different therapies use today. New York: New American Library; 1980.

[10] Kazdin, AE. The evaluation of psychotherapy: Research design and methodology. In Garfield SL, Bergin AE, editors. Handbook of psychotherapy and behavior change. 3rd ed. New York: Plenum; 1986.

Capítulo 13. Estudio comparativo de la prevalencia de tuberculosis bovina en suidos domésticos y silvestres en el sur de España

Carlos Expósito Cárdenas, Ignacio García Bocanegra

Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria Departamento de Sanidad Animal.

Edificio de Sanidad Animal, 2ª planta. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba, España.
cexpositocardenas@gmail.com

Resumen

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infecciosa crónica causada por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Mientras que el jabalí (*Sus scrofa*) ha demostrado ser el principal reservorio natural de la TBb en España, el cerdo doméstico se ha considerado tradicionalmente poco relevante debido a su cría en intensivo. Sin embargo, el cerdo ibérico criado en sistemas extensivos del sur y oeste de España puede desempeñar un papel diferente en la epidemiología de la TBb. Los objetivos del presente estudio fueron determinar la seroprevalencia y los factores de riesgo potencialmente asociados a la infección por TBb en cerdo ibérico y jabalíes en la provincia de Córdoba. Durante los años 2015 y 2016 se obtuvieron muestras de sangre de 650 cerdos ibéricos y 214 jabalíes abatidos en la provincia de Córdoba. La detección de anticuerpos se realizó mediante dos ensayos inmunoenzimáticos "ELISA in-house". La seroprevalencia en cerdo ibérico fue del 1,5% (10/650; $IC_{95\%}$: 0,6-2,5) y del 53,7% en jabalí (115/214; $IC_{95\%}$: 47,1-60,4). La baja seroprevalencia encontrada en cerdo ibérico indica un limitado riesgo de infección en explotaciones de origen, mientras que los resultados obtenidos en jabalí confirman a esta especie como reservorio de TBb en la provincia de Córdoba.

Fundamento

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infecciosa crónica causada por Mycobacterium bovis (M. bovis) y otros miembros del complejo Mycobacterium tuberculosis (CMT), que afecta a diversas especies de mamíferos, incluido el hombre. Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas a la ganadería asociadas a la disminución de la producción, decomisos en matadero, restricciones de movimiento de animales vivos y sacrificio de animales positivos. Asimismo, la TBb está incluida dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE, estando sometida en España a un programa de erradicación nacional cofinanciado por la UE en el ganado bovino.

Aunque el ganado bovino está considerado como el principal reservorio de la TBb, diversos estudios indican el papel de otras especies domésticas y silvestres como reservorios o potenciales reservorios de la TBb en nuestro país. En el caso de los cerdos domésticos, su papel epidemiológico se ha considerado poco relevante debido al uso de sistemas intensivos y sacrificio a una edad temprana. Sin embargo, la situación es diferente en zonas del sur y oeste de España, donde los cerdos de raza ibérica son criados en sistemas extensivos asociados a la dehesa.

Por su parte, el jabalí es el principal reservorio silvestre de TBb en España. Así, su capacidad para mantener la tuberculosis en ausencia de ganado doméstico u otros ungulados silvestres, y el frecuente desarrollo de lesiones generalizadas con un alto potencial de diseminación, confirman este hecho [1].

Por ello, los objetivos del presente trabajo son: (1) Determinar la seroprevalencia de infección por TBb en explotaciones de cerdo ibérico y poblaciones de jabalíes en la provincia de Córdoba. (2) Realizar un estudio epidemiológico para determinar factores de riesgo potencialmente implicados en la transmisión de TBb en estas especies.

Metodología

Durante los años 2015 y 2016 se obtuvieron muestras de sangre de 650 cerdos ibéricos (464 animales de cebo y 186 reproductores) procedentes de 20 explotaciones en la provincia de Córdoba. Los cerdos de cebo se muestrearon de forma previa y durante la montanera. Asimismo, durante la temporada cinegética 2015-2016 se tomaron muestras de 214 jabalíes abatidos en monterías mediante punción del seno cavernoso de la duramadre [2]. Las muestras de sangre se dispensaron en tubos estériles sin anticoagulante y se transportaron en refrigeración al laboratorio de diagnóstico de enfermedades infecciosas del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba. Estas muestras fueron procesadas y se conservó el suero resultante a -20 ºC hasta su posterior análisis.

La detección de anticuerpos frente a *M. bovis* se realizó mediante el empleo de dos análisis inmuno-enzimático (ELISA) "in house" realizados en paralelo empleando dos proteínas antigénicas (PPDb y PPDb tratada). La prevalencia de anticuerpos frente a TBb se estimó a partir de la relación entre resultados positivos y la suma del número de animales examinados, con la exacta binomial y un intervalo de confianza del 95%. Las asociaciones entre los resultados serológicos y variables independientes se analizaron empleando el test de Chi-cuadrado ($\chi 2$) de Pearson o el test de Fisher. Valores de $P<0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software informático SPSS^{G} v20.0 Statistics.

Resultados

La seropositividad en cerdo ibérico osciló entre el 0,9% (IC95%: 0,2-1,7) tomando el criterio más restrictivo (resultados positivos a los dos ELISA), y el 1,5% (IC95%: 0,6-2,5) empleando el criterio menos restrictivo (resultados positivo a alguno de los dos ELISA). El valor de kappa fue 0,75 indicando una concordancia adecuada entre ambos ELISAs. Por su parte, la seroprevalencia en jabalí osciló entre el 45,8% (IC95%: 39,1-52,5) y el 53,7% (IC95%: 47,1-60,4). El valor de kappa fue 0,84, mostrando una concordancia casi perfecta entre ambas técnicas. En 11 de los 12 (91,7%) cotos muestreados se encontró al menos un animal seropositivo. La seroprevalencia obtenida en jabalí fue significativamente superior ($P<0,001$) comparada con el cerdo ibérico.

Los valores de Kappa obtenidos para las diferentes técnicas serológicas mostraron una elevada concordancia en ambas especies de suidos, indicando que los análisis inmunoenzimáticos son una herramienta de screening útil para el diagnóstico de infecciones por CMT en las poblaciones de suidos domésticos y silvestres. Estas técnicas permiten procesar un elevado número de sueros y facilitando la vigilancia epidemiológica de la TBb.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los cerdos analizados en nuestro estudio fueron muestreados antes o en el comienzo de la montanera, nuestros resultados indican un bajo riesgo de infección por CMT en las explotaciones de origen. No obstante, durante el periodo de montanera los animales entran en contacto con ungulados silvestres y ganado bovino, considerándose este un periodo crítico para la infección. Así, las bajas seroprevalencias detectadas en cerdo ibérico en este estudio (0,9-1,5%) podrían explicarse por el hecho de que la mayoría de los animales analizados no hubieran pasado aún por este periodo.

La elevada seroprevalencia observada en jabalí (53,7%), así como la elevada dispersión en los cotos muestreados (91,7%), confirma el papel del jabalí como reservorio silvestre de la TBb en los ecosistemas mediterráneos de la Península Ibérica [1]. Nuestros resultados coinciden con estudios realizados en zonas del centro y sur de la Península ibérica, los cuales indican una situación endémica de TBb en jabalíes con seroprevalencias comprendidas entre el 35,2% y 73,3% [3,4].

El análisis de factores de riesgo se realizó exclusivamente en muestras de jabalí debido a la baja seroprevalencia obtenida en cerdo ibérico. Se observaron seroprevalencias significativamente superiores en jabalíes adultos en relación a los jóvenes. Estos resultados podrían estar asociados a la cronicidad de la enfermedad y la mayor probabilidad de exposición al patógeno a lo largo de la vida del animal [5]. La alta seropositividad en animales adultos sugiere la vía horizontal como vía de contagio más importante en las poblaciones analizadas.

Asimismo, nuestros resultados mostraron un incremento significativo de seroprevalencia de TBb en cotos con presencia de gamos, lo cual podría estar relacionado con el comportamiento gregario de esta especie. Además, la seroprevalencia fue significativamente superior en cotos donde se llevaron a cabo repoblaciones de jabalí y aquellos con abundancia de matorral. Estos hallazgos podrían asociarse a una ausencia de control sanitario durante las repoblaciones, lo que facilitaría la diseminación geográfica de la TBb en las poblaciones de ungulados silvestres [3]. Por su parte, Vicente y cols. [6] sugirieron que la mayor seropositividad en cotos con presencia de matorral podría deberse a que propician la aparición de condiciones ambientales beneficiosas para la supervivencia de micobacterias.

Conclusiones

1. Los resultados del presente trabajo confirman la utilidad de las técnicas ELISA para la detección de anticuerpos frente a CMT en diferentes especies de suidos.

2. La seroprevalencia detectada en cerdo ibérico indica una baja circulación de CMT en las explotaciones de origen.

3. Nuestros resultados muestran una elevada seroprevalencia y dispersión de CMT en las poblaciones de jabalíes, confirmando el papel de esta especie como reservorio natural de la TBb en la provincia de Córdoba.

4. La mayor seroprevalencia de TBb en jabalíes adultos, sugiere la vía horizontal como la vía de contagio más importante en el ecosistema mediterráneo. Por otro lado, la presencia de gamos, la práctica de repoblaciones de jabalíes y abundancia de matorral en las fincas, son factores de riesgo asociados con la prevalencia de TBb en esta especie.

Bibliografía

[1] V. Naranjo, C. Gortázar, J. Vicente, J. De La Fuente, Vet. Microbiol. 127 (2008) 1-9.

[2] A. Arenas-Montes, I. García-Bocanegra, J. Paniagua, J.J. Franco, F. Miró, M. Fernández-Morente, A. Arenas, Eur. J. Wildl. Res. 59 (2013) 299-303.

[3] M. Boadella, K. Lyashchenko, R. Greenwald, J. Esfandiari, R. Jaroso, T. Carta, C. Gortázar, J. Vet. Diagn. Invest. 23 (2011) 77-83.

[4] D. Cano-Terriza, J. Paniagua, A. Arenas-Montes, S. Jiménez-Ruiz, E. Jurado-Tarifa, I. Cuevas-Gómez, C. Borge, A. Carbonero, I. García-Bocanegra, I Congreso de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2016, Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a M. bovis en ungulados silvestres de Sierra Morena.

[5] I. García-Bocanegra, B.P. de Val, A. Arenas-Montes, J. Paniagua, M. Boadella, C. Gortázar, A. Arenas, PloS One 7 (2012) e34908.

[6] J. Vicente, U. Höfle, J.M. Garrido, P. Acevedo, R. Juste, M. Barral, C. Gortázar, Vet. Res. 38 (2007) 451-464.

Capítulo 14. Efecto del tratamiento con metformina sobre los ejes reguladores hipotálamo-hipofisarios en obesidad

Vicente Herrero Aguayo

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Dirección: Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Ed. Severo Ochoa (C-6), tercera planta. Campus Universitario de Rabanales. E-mail: b22heagv@uco.es

Resumen

La obesidad es una enfermedad endocrino-metabólica que se ha convertido en unos de los principales problemas sanitarios en países industrializados. En el desarrollo de esta enfermedad están implicados múltiples factores ambientales, genéticos y hormonales. El adecuado funcionamiento de los ejes neuroendocrino—metabólicos es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del organismo y están involucrados en el desarrollo de la obesidad. Se ha observado que la metformina, un fármaco usado en la actualidad para el tratamiento de la diabetes es capaz de controlar el incremento de peso en los pacientes obesos. Sin embargo, sus efectos sobre el eje endocrino metabólico hipotálamo/hipofisario en individuos obesos no son del todo conocidos. El objetivo del estudio ha sido determinar el efecto de la metformina sobre el perfil metabólico y sobre los ejes reguladores de interés mediante la caracterización de los niveles de expresión de los componentes reguladores de los diferentes ejes hipotálamo-hipofisarios en ratones controles y tratados con metformina sometidos a dieta normal y rica en grasa. Los resultados muestran que la metformina disminuye la ganancia de peso en los ratones obesos y que podría controlar los ejes de la GH y las gonadotropinas sin afectar otros ejes hipotalámo/hipofisarios.

Fundamento

La **obesidad** es una enfermedad endocrino-metabólica crónica de gran incidencia en el siglo XXI [1]. En ella están implicados múltiples factores ambientales, genéticos y hormonales en su desarrollo. El adecuado funcionamiento del **eje neuroendocrino-metabólico** es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, de forma que los defectos de su regulación conducen con frecuencia a graves patologías, tales como la obesidad, diabetes e incluso cáncer. En el complejo proceso de modulación de la homeostasis juega un papel esencial la regulación precisa de la secreción de neuropéptidos y hormonas, pues su disfunción puede provocar una liberación tanto excesiva como deficiente de estos factores que, a su vez, son la causa de desordenes endocrino-metabólicos [1,2]. El hipotálamo es una región nuclear del cerebro que forma parte del diencéfalo, y se encuentra situado por debajo del tálamo. Tiene diversas funciones como son: la regulación de la liberación de hormonas por parte de la hipófisis, la regulación de la temperatura corporal y el control de la alimentación, ingesta de líquidos, apareamiento y agresión. La hipófisis, conectada funcional y anatómicamente con el hipotálamo, es una glándula endocrina que se encuentra en la base del cráneo. Es la encargada de secretar numerosas hormonas que regulan diversos tejidos y glándulas. Todo esto hace que esta glándula esté implicada en el control de funciones como el crecimiento, la reproducción o el metabolismo, etc [3]. Debido al número y relevancia de las hormonas secretadas por el eje hipotálamo-hipofisario, el control preciso de las secreciones de este eje es fundamental para el correcto mantenimiento de la homeostasis del organismo; de hecho, desregulaciones en los diversos ejes hipotálamo-hipofisarios están asociadas al desarrollo y progresión de múltiples alteraciones patológicas, entre las que puede estar la obesidad. Así, se conoce, por ejemplo, que en estados de obesidad los niveles de GH se encuentran reducidos, lo que genera, entre otros efectos metabólicos, una resistencia a la insulina, una disminución del metabolismo lipolítico, hiperinsulinemia, etc. [4] y, por lo tanto, cualquier alteración de esta hormona o de sus controladores primarios, como la somatostatina podrían estar involucrados en el desarrollo y/o progresión de patologías endocrino-metabólicas como la obesidad o la diabetes.

Debido a la creciente incidencia de la obesidad en la población mundial, cada vez es más necesaria la identificación de tratamientos específicos para tratar esta patología y sus comorbilidades. En este sentido, una vía muy prometedora para el abordaje clínico-terapéutico de las comorbilidades asociadas a la obesidad es la **metformina.** Este fármaco, perteneciente a la familia de las biguanidas, es considerado actualmente el medicamento de elección para el tratamiento de la diabetes; sin embargo, estudios recientes indican que el tratamiento con metformina ejerce efectos beneficiosos sobre algunas de las complicaciones asociadas a la obesidad. Así, se sabe que la metformina disminuye los niveles de glucosa reduciendo la producción de glucosa hepática, suprimiendo de esta manera la gluconeogénesis. Además disminuye la absorción de glucosa intestinal y aumenta la captación y utilización de la glucosa por parte de tejidos periféricos, como puede ser el tejido adiposo [5]. Sin embargo, la eficacia y los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales la metformina podría regular el eje hipotálamo/hipofisario en individuos con normopeso y/u obesos son desconocidos.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la **hipótesis** del presente trabajo es que determinadas alteraciones de los ejes reguladores hipotálamo-hipofisarios podrían jugar un papel clave en el desarrollo y/o progresión de la obesidad y sus comorbilidades asociadas originando un escenario de desregulación endocrino-metabólica donde la metfomina podría ejercer acciones terapéuticas revirtiendo algunos de estos cambios y paliando algunas de estas complicaciones.

Metodología

Para llevar a cabo el estudio se generaron dos grupos experimentales basados en las dietas inducidas. En concreto, se partió de 40 ratones de la cepa FVB/N que, a las 10 semanas de edad, se separaron en dos grupos (n=20 animales por grupo) que fueron sometidos a una dieta baja en grasa (LFD) o a una dieta alta en grasa (HFD) durante 28 semanas (hasta las 38 semanas de edad). A las 32 y 33 semanas de edad se realizaron, respectivamente, un test de tolerancia a la glucosa (GTT) y un test de resistencia a la insulina (ITT), para comprobar la efectividad de la dieta HFD en la inducción de un estado metabólico de obesidad. Desde la semana 38, todos los animales continuaron con sus dietas pero la mitad de los ratones de cada grupo (n=10) se comenzaron a tratar con metformina (250 mg/kg/día diluida en el agua). Durante las semanas 47 y 48 de edad se realizaron las segundas GTT e ITT para determinar el efecto de la metformina en el perfil metabólico de los ratones. Durante ambas fases (pre- y post-metformina), se ha determinado la ingesta de agua y alimento, así como la composición corporal (masa grasa, masa magra y contenido de agua) de cada uno de los animales incluidos en el estudio. Al comienzo de la semana 51 los ratones se sacrificaron por decapitación y todos los órganos de interés (hipotálamo, hipófisis) fueron diseccionados por personal cualificado e inmediatamente congelados para el análisis posterior.

Posteriormente se procedió a la caracterización de los perfiles de expresión de los distintos genes de interés. Para ello, en primer lugar se diseñaron primers específicos que fueron validados mediante PCR convencional, electroforesis y purificación de ADN, para comprobar que eran específicos y que sólo amplificaban los genes para los que habían sido diseñados. Se realizó una extracción de ARN de los tejidos hipofisarios e hipotalámicos de todos los ratones mediante un kit de extracción por columnas. Posteriormente se realizó una retrotranscripción de todas las muestran con el objetivo de obtener ADNc. Por último, se midieron los niveles de expresión de los genes seleccionados mediante qPCR.

Resultados

Desarrollo del modelo de obesidad. Para comprobar el estado de obesidad inducido en los ratones mediante una dieta rica en grasa se analizó la evolución de los pesos. Pudimos ver un aumento significativo del peso en el grupo HFD respecto al LFD a partir de la semana 17 de dieta. El análisis de la GTT nos demostró una dificultad por parte de estos ratones obesos para metabolizar la glucosa lo que corroboró el estado de obesidad e insulino resistencia inducido. Posteriormente se estudió el efecto del tratamiento con metformina que demostró un descenso en el peso ganado por parte del grupo HFD tratado con metformina respecto al grupo HFD control. En cuanto a los grupos tratados con dieta baja en grasa no se observaron diferencias significativas en los pesos. Paralelamente se estudiaron otros parámetros que ayudasen a confirmar el estado de obesidad y del tratamiento con metformina. Se midieron los niveles de ingesta de alimento y agua. En lo referido al alimento se puede ver un descenso significativo en la ingesta por parte del grupo HFD (aunque mayor aporte calórico). En cuanto al tratamiento con metformina no se observaron variaciones en las mediciones de la ingesta de los distintos grupos experimentales. La medición de la ingesta de agua muestra un descenso significativo en el grupo HFD. También se puede observar un aumento significativo en esta ingesta en los grupos tratados con metformina lo que demuestra un efecto positivo por parte del tratamiento. Los resultados obtenidos por el MRI referidos al porcentaje de masa grasa y magra muestran un aumento en los grupos HFD de la cantidad de masa grasa respecto a los grupos LFD. En cuanto a la masa magra ocurre lo opuesto, los ratones obesos muestran un menor porcentaje que los ratones con dieta baja en grasa. Por último el análisis de los niveles de insulina muestran un efecto de la metformina disminuyendo los niveles del grupo HFD

tratado con metformina respecto al grupo HFD control lo que demuestra un efecto insulino-sensibilizante por parte de la metformina.

Caracterización de los perfiles de expresión de ARNm. El análisis de los perfiles de expresión de los distintos genes estudiados muestra un efecto de la dieta a nivel hipofisario afectando al eje somatotropo y gonadotropo. También se puede apreciar el efecto del tratamiento con metformina ya que se observan menores niveles de expresión de la hormona del crecimiento en los grupos tratados con este fármaco. Sin embargo no se observaron cambios en la expresión de otras hormonas implicadas en otros ejes reguladores como el corticotropo. En lo referido al nivel de expresión en el hipotálamo no se observaron variaciones significativas aunque sí se observó un efecto del tratamiento en la expresión del factor liberador de corticotropina. El estudio de la expresión de otros genes relacionados con el eje regulador hipotálamo-hipofisario nos mostró cambios que indicaban que la metformina y la dieta afectaban en la regulación hormonal. También se observaron cambios en los niveles de expresión del receptor de insulina que confirmaban un efecto del tratamiento sobre la señalización de la insulina a nivel hipofisario.

Conclusiones

En cuanto al modelo de obesidad podemos concluir que la metformina es capaz de reducir el incremento de peso inducido por la dieta alta en grasa (HFD) en ratones, posiblemente a través de un mecanismo relacionado con la disminución de la ingesta de alimento. Además este tratamiento es capaz de reducir la hiperinsulinemia inducida por la obesidad, sin alterar significativamente los niveles de glucosa, lo que sugiere que podría mejorar la sensibilidad a insulina observada en los ratones obesos. En lo referentes a la expresión de ARNm podemos decir que la metformina podría ejercer parte de sus funciones a través del control del funcionamiento de los ejes de la GH y de las gonadotropinas, actuando directamente a nivel hipofisario para regular su expresión o modular la expresión de algunos de sus controladores primarios, como la ghrelina. Por último podemos pensar que el papel de la metformina sobre moléculas implicadas en el metabolismo de la glucosa o la insulina parece ser tejido-dependiente.

Bibliografía

[1] Kaidar-Person O, Bar-Sela G, Person B. The two major epidemics of the twenty-first century: Obesity and cancer. Obes Surg. 2011;21(11):1792–7.

[2] Hursting SD, Hursting MJ. Growth signals, inflammation, and vascular perturbations: Mechanistic links between obesity, metabolic syndrome, and cancer. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(8):1766–70.

[3] Eigler T, Ben-Shlomo A. Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. J Mol Endocrinol. 2014;53(1):R1–19.

[4] Luque RM, Kineman RD. Impact of obesity on the growth hormone axis: Evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. Endocrinology. 2006;147(6):2754–63.

[5] Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: From mechanisms of action to therapies. Cell Metab [Internet]. 2014;20(6):953–66. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.018.

Capítulo 15. Situación epidemiológica de Pestivirus en el Parque Nacional de Doñana: evaluación de la interacción entre rumiantes domésticos y silvestres

Saúl Jiménez Ruiz, Ignacio García Bocanegra, María de los Ángeles Risalde Moya

Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal

Edificio de Sanidad Animal, 2ª planta. Campus de Rabanales. 14071 Córdoba, España.
saul25may@hotmail.com

Resumen

En la Península Ibérica se ha descrito una amplia variedad de escenarios epidemiológicos en relación a los Pestivirus de rumiantes (Virus de la Diarrea Vírica Bovina -VDVB- y Virus de la Enfermedad de la Frontera -VEF-). Sin embargo, la información relativa al papel de los rumiantes silvestres como reservorios naturales de Pestivirus en ecosistemas mediterráneos sigue siendo limitada. Durante los meses de octubre y noviembre de 2015 se obtuvieron muestras de suero de 138 bovinos mantenidos en extensivo en el Parque Nacional de Doñana (PND), así como muestras de 101 ciervos (*Cervus elaphus*) y 102 gamos (*Dama dama*) que compartían hábitat con el bovino analizado. La presencia de anticuerpos específicos frente a la proteína p80 de Pestivirus se evaluó mediante ELISA de bloqueo (bELISA) y tests de seroneutralización vírica (TSV) (cepas VDVB-1, VDVB-2 y VEF-4). Todas las muestras de suero se analizaron para detectar la presencia de ARN de Pestivirus mediante RT-PCR. El 2,2% (tres de 138) de los bovinos fueron positivos a ELISA y TSV (mayores títulos frente a VDVB-1) mientras que todos los rumiantes silvestres resultaron seronegativos. No se detectó ARN vírico en ninguno de los animales analizados. La prevalencia obtenida indica una limitada circulación de Pestivirus en el ganado bovino así como la ausencia de circulación en la población de rumiantes silvestres muestreada, sugiriendo que éstos últimos no representan actualmente un riesgo en la transmisión de Pestivirus para el ganado en el PND.

Fundamento, Metodología, Resultados y Conclusiones

Los Pestivirus son virus ARN de cadena simple pertenecientes a la familia *Flaviviridae.* Dentro del género Pestivirus se han descrito 4 especies que afectan a bovinos, pequeños rumiantes y suidos. Los Pestivirus que afectan a rumiantes son el virus de la diarrea vírica bovina, tipo 1 y tipo 2 (VDVB-1 y VDVB-2), y el virus de la enfermedad de la frontera (VEF), con sus respectivas subespecies. Estos virus presentan distribución mundial y gran repercusión económica [1].

En rumiantes domésticos, la vía de infección condiciona en gran medida la presentación clínica de la enfermedad [2]: cuando la infección tiene lugar después del nacimiento, sigue un curso mayormente asintomático. Sin embargo, si se infecta durante la gestación, el virus es capaz de atravesar la barrera transplacentaria y provocar trastornos reproductivos tales como reabsorción embrionaria, abortos o infección persistente del feto (primer tercio de gestación). En este último caso, los individuos quedarán immunotolerantes o persistentemente infectados (IPIs). El sistema inmunitario de los IPIs no reconoce los antígenos víricos y por tanto, no genera una respuesta inmunitaria frente a ellos. Esta situación permite la replicación y diseminación constante del virus durante toda la vida del IPI, adquiriendo éste un papel fundamental en la difusión de la enfermedad en rebaños infectados y otras especies simpátricas [3]. La información relativa a la sintomatología en rumiantes silvestres es más limitada y procede de estudios experimentales para el VDVB, y de los brotes de mortalidad descritos en rebeco pirenaico (*Rupicapra pyrenaica*) desde los años dos mil para el VEF.

El Parque Nacional de Doñana (PND) es un espacio natural protegido situado al oeste de Andalucía, con una biodiversidad única en Europa debido a los múltiples ecosistemas que lo integran. Entre los cotos y la marisma se extiende una franja denominada vera, que corresponde a un ecotono de gran riqueza ecológica donde frecuentemente interaccionan los rumiantes que habitan el Parque. El ganado bovino permanece separado en las distintas fincas por vallado ganadero mientras que ciervos (*Cervus elaphus*) y gamos (*Dama dama*) no encuentran limitaciones para atravesarlo provocando agregaciones espaciales, con el consiguiente riesgo de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas.

Los objetivos del presente estudio son: (1) determinar la prevalencia de infección por Pestivirus en rumiantes domésticos y silvestres en el PND y (2) evaluar el papel epidemiológico de estas especies como reservorios naturales de Pestivirus.

El presente trabajo se realizó en cinco fincas incluidas en el PND (Figura 1). Durante los meses de octubre y noviembre de 2015 se obtuvieron muestras de 341 rumiantes que compartían hábitat incluyendo, 138 bovinos de raza Marismeña, 101 ciervos y 102 gamos. La toma de muestras se realizó mediante punción de la vena caudal mediana en bovino y mediante punción de los senos venosos endocraneales en los rumiantes silvestres [4]. Las muestras de sangre obtenidas se refrigeraron y enviaron al Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba, donde se centrifugaron para la obtención del suero, el cual fue conservado a -20 ºC hasta su análisis laboratorial.

La detección de anticuerpos específicos frente a la proteína p80 de Pestivirus se realizó empleando un test inmunoenzimático de bloqueo comercial (bELISA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La confirmación de los resultados positivos y dudosos del bELISA se realizó mediante test de seroneutralización vírica (TSV) empleando los Pestivirus detectados en rumiantes en España hasta la fecha (VDVB-1, VDVB-2 y VEF-4). Todas las muestras de suero se analizaron mediante RT-PCR para la detección de ARN vírico de

Pestivirus. La información relacionada con el manejo del ganado, fauna silvestre, condiciones de bioseguridad y datos individuales, se recogieron mediante diferentes modelos de encuesta epidemiológica.

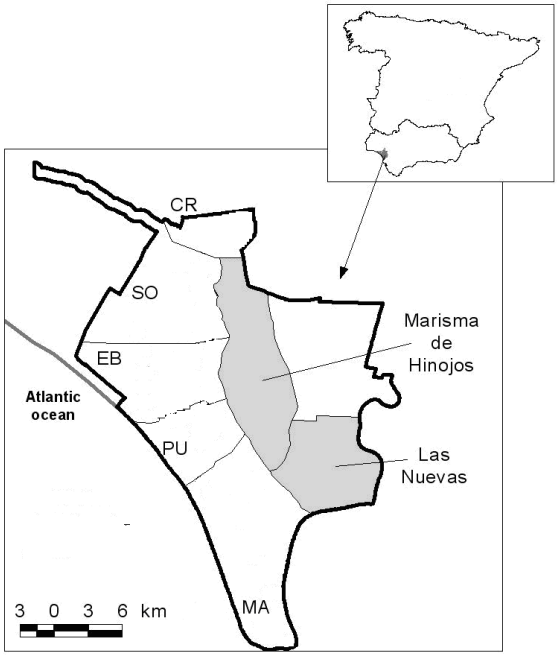


Figura 1. Zonificación del Parque Nacional de Doñana (CR, Coto del Rey; SO, Los Sotos; EB, Estación Biológica; PU, El Puntal; MA, Marismillas).

De los 341 rumiantes muestreados, 35 bovinos, 13 ciervos y 1 gamo resultaron positivos o dudosos a bELISA. El TSV confirmó la positividad de tres vacas, detectándose los títulos más elevados frente al genotipo 1 del VDVB. La seroprevalencia estimada fue del 2,2% en el ganado bovino y 0% en los rumiantes silvestres. No se detectó ARN vírico en ninguna de las muestras de suero analizadas por RT-PCR.

El papel de los rumiantes silvestres en el ciclo epidemiológico de Pestivirus es actualmente objeto de controversia. Algunos autores sostienen que los rumiantes silvestres actúan como hospedadores para el ganado doméstico. Sin embargo, otros autores describen ciclos epidemiológicos independientes. Los resultados observados en el presente estudio están en concordancia con esta segunda hipótesis [5]. Además, las seroprevalencias obtenidas indican una limitada circulación de Pestivirus en el área de estudio. En el ganado, la seroprevalencia detectada en el PND resultó considerablemente inferior a los datos previamente publicados en el resto de España y Europa [6]. Esta situación podría estar asociada tanto a la ausencia de reposición externa como a una mayor resistencia genética a la infección propia de la raza [7,8]. En este sentido, la raza Marismeña es una raza autóctona del PND, en peligro de extinción desde 1994, caracterizada por mantenerse en régimen extensivo y en aislamiento territorial desde el siglo XIX [9]. En cualquier caso, son necesarios estudios adicionales para confirmar estas hipótesis.

En rumiantes silvestres, nuestros resultados son consistentes con la gran mayoría de los publicados en España y el resto de Europa [5], sugiriendo que estas especies no tienen un papel importante en la epidemiología de las Pestivirosis. No obstante, un reciente estudio [10] realizado en el Centro de España muestra una prevalencia de Pestivirus próxima al 20% en

ciervos, asociada a la sobreabundancia de esta especie y la interacción con ganado bovino infectado en la región.

Los resultados positivos frente a los tres Pestivirus incluidos en el TSV podrían relacionarse con infecciones mixtas o, más probablemente, con reacciones cruzadas entre Pestivirus. Los títulos más elevados sugieren que una cepa de genotipo 1 del VDVB podría ser la responsable de las infecciones en el área de estudio, puesto que dicho título resultó ser tres veces superior al resto de virus analizados en el mismo animal, de acuerdo con el criterio de la OIE. Estos resultados son similares a los obtenidos por estudios previos en otras regiones de España y Europa [6].

Tan sólo un 3 de las 31 muestras positivas inicialmente a ELISA se confirmaron por TSV, considerándose como falsos positivos las 28 muestras restantes. Estas discrepancias podrían estar asociadas a que la técnica bELISA utilizada no se encuentra validada para rumiantes silvestres, lo cual puede alterar los valores de sensibilidad y especificidad. Además, la circulación de otras cepas de Pestivirus en el PND con limitada reacción cruzada con las utilizadas en el presente estudio originaría resultados negativos en el TSV y positivos a bELISA. En este sentido, la detección de ARN vírico mediante RT-PCR y su posterior aislamiento o secuenciación permitirían realizar el TSV con la cepa o cepas circulantes en la región. Como todos los sueros resultaron RT-PCR negativos, no podemos descartar esta hipótesis.

Las conclusiones de este estudio son: (1ª) La prevalencia obtenida indica una limitada circulación de Pestivirus en el ganado bovino en el PND. Los resultados serológicos sugieren que el Pestivirus que circula en el ganado doméstico en la zona de estudio es el genotipo 1 del VDVB; y (2ª) La ausencia de rumiantes silvestres seropositivos indica que estas especies no representan actualmente un riesgo en la transmisión de Pestivirus para el ganado doméstico en el PND. Aunque nuestros resultados señalan la existencia de un ciclo epidemiológico independiente de Pestivirus en el ganado bovino, la presencia de poblaciones de rumiantes silvestres no protegidas podría favorecer la aparición de brotes y animales persistentemente infectados tras la introducción de un Pestivirus en el PND.

Bibliografía

[1] H.J. Thiel, M.S. Collett, E.A. Gould, F.X. Heinz, M. Houghton, G. Meyers, R. Purcell, C.M. Rice, in: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball (Eds), Virus Taxononomy: Eighth report of the intemational committee on taxonomy of viruses, Elsevier/Academic Press, London, 2005, p.981-998.

[2] M. Schweizer, E. Peterhans, Annu Rev Anim Biosci. 2 (2014) 141-163.

[3] Š. Vilček, P.F. Nettleton, Vet Microbiol. 116 (2006) 1-12.

[4] S. Jiménez-Ruiz, A. Arenas-Montes, D. Cano-Terriza, J. Paniagua, J. Pujols, F. Miró, X. Fernández-Aguilar, M.A. González, J.J. Franco, I. García-Bocanegra, Eur J Wildl Res. (2016) Aceptado.

[5] J. Paniagua, I. García-Bocanegra, A. Arenas-Montes, E. Berriatua, J. Espunyes, A. Carbonero, R. Rosell, I. Marco, O. Cabezón, Vet Rec. 178 (2016) 215-215.

[6] BVDzero, http://www.bvdzero.com Último acceso: 25 de Agosto de 2016

[7] P. Presi, R. Struchen, T. Knight-Jones, S. Scholl, D. Heim, Prev Vet Med. 99 (2011) 112-121.

[8] D.P. Berry, Anim Health Res Rev. 15 (2014) 151-6.

[9] J. Quiroz, A. Martínez, J. Marques, J. Calderón, J. Vega-Pla, Arch. Zootec. 56 (2007) 449-454.

[10] V. Rodríguez-Prieto, D. Kukielka, B. Rivera-Arroyo, B. Martínez-López, A.I. de las Heras, J.M. Sánchez-Vizcaíno, J. Vicente, BMC Vet Res. 12 (2016) 1.

Capítulo 16. Modulación del proteoma redox tiólico por redoxinas: mecanismos e implicaciones en el metabolismo del hierro, la función mitocondrial y la apoptosis

López-Grueso, MJ. & Padilla, CA.

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa 1ª planta, Este. q02logrm@uco.es

Resumen

Los sistemas Tiorredoxina (Trx) y Glutarredoxina (Grx)/glutatión (GSH) protegen a la célula del estrés oxidativo y el efecto antiproliferativo del óxido nítrico (NO) se deben en su mayor parte a la modificación postraduccional por S-nitrosilación de restos de cisteína estructural y funcionalmente importantes. Además, se ha demostrado que la Trx tiene actividad desnitrosilasa. Por otro lado, se ha encontrado que el tratamiento con el compuesto antitumoral Sorafenib reduce las modificaciones postraduccionales dependientes de estrés oxidativo y nitrosativo. El objetivo de este estudio, además de cuantificar el Proteoma global en células de hepatocarcinoma en diferentes grados de diferenciación, es poner a punto la técnica 'Biotin-Switch' en células que sobreexpresan la Óxido Nítrico Síntasa-3 (NOS3) para demostrar que los cambios redox observados son debido a nitrosilaciones. La caracterización de la expresión de proteínas en las tres líneas celulares (HepG2, SNU423, y SNU475) muestra que 38,66% de las proteínas identificadas cambian su expresión. Las tres líneas celulares no comparten proteínas diana del Sorafenib y Trx1, y además, la línea SNU475 muestra más proteínas afectadas por el tratamiento. La puesta a punto de la técnica 'Biotin-Switch' en células que sobreexpresan NOS3 ha permitido ver el perfil de nitrosilación e identificar proteínas dianas de nitrosilación.

Fundamento

Los sistemas Tiorredoxina (Trx) y Glutarredoxina (Grx)/glutatión (GSH) protegen a la célula del estrés oxidativo a través de mecanismos de regulación redox que se basan en la oxidación reversible de residuos de cisteína (Cys) en proteínas dianas [1]. Ambas redoxinas tienen actividad desglutationilasa, y además la Trx también tiene actividad desnitrosilasa y transnitrosilasa [2]. El óxido nítrico (NO) es una molécula de señalización redox que juega un papel pro- y anti-apoptótico dependiendo de su localización, concentración, el tipo de célula diana, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros factores. El efecto antiproliferativo del óxido nítrico (NO) se deben en su mayor parte a la modificación por S-nitrosilación de restos de cisteína estructural y funcionalmente importantes en proteínas de vías de señalización clave y se ha demostrado que la Trx tiene actividad desnitrosilasa. Por otro lado, se ha encontrado que el tratamiento con el compuesto antitumoral Sorafenib reduce las modificaciones postraduccionales dependientes de estrés oxidativo y nitrosativo [3].

En las células de hepatocarcinoma (HepG2), y condiciones usadas en este estudio, el NO tiene una acción antiproliferativa. Los efectos del NO se basan en la modificación post-traduccional redox (PTM) de residuos de cisteína (Cys) mediante la formación de S-nitrosotioles en proteínas diana que actúan como interruptores moleculares [4]. El tratamiento con Sorafenib de células de hepatocarcinoma también ha mostrado tener un efecto antiproliferativo. Resultados previos, ha permitido al grupo demostrar, mediante el análisis exhaustivo del Proteoma Redox, que la Grx y Trx juegan un papel importante en la homeostasis redox celular en células humanas de hepatocarcinoma (HepG2).

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido demostrar si estos cambios redox observados son debido a nitrosilaciones. Para ello, se ha puesto a punto la técnica "Biotin-Switch" [5] y se han analizado las proteínas totales nitrosiladas en las distintas condiciones, así como el estado de nitrosilación de proteínas específicas que habían mostrado cambios significativos en el Proteoma Redox. El otro gran objetivo del proyecto ha sido el estudio de los cambios en el proteoma redox de las células de hepatocarcinoma en diferentes estados de diferenciación a las que se les ha silenciado la Trx1 y/o tratado con Sorafenib. En estas muestras se ha cuantificado el Proteoma Global diferencial en las distintas situaciones mediante análisis "label-free" con el software Progenesis QI for Proteomics. Posteriormente, se está cuantificando el Proteoma Redox mediante la selección de los péptidos cisteínicos etiquetados para llevar a cabo un análisis SRM de los mismos con el software Skyline y determinar la ratio Cys-SH/Cys-Ox de cada proteína.

Metodología

- Preparación de las muestras celulares:
    - Células HepG2 que sobreexpresan NOS-3 con y sin silenciamiento de la Trx1
    - Células HepG2, SNU423 y SNU475 tratadas con Sorafenib y/o siRNA Trx1
- Análisis proteómico por LC-MS/MS.
- Cuantificación del Proteoma Global ('Progenesis QI for proteomics')
- Cuantificación del Proteoma Redox ('Skyline')
- Puesta a punto de la identificación de proteínas nitrosiladas mediante la técnica 'Biotin-Switch' seguida de Western Blot

- Puesta a punto de identificación de cisteínas nitrosiladas a través del 'Biotin-Switch' y su posterior análisis por LC-MS/MS

Resultados

Un protocolo para el análisis exhaustivo del Proteoma Redox nos ha permitido demostrar que la Trx juega un papel importante en la homeostasis redox celular, además de que obstaculiza el efecto antiproliferativo del NO en células HepG2 y que el silenciamiento de Trx1, provoca la activación de la apoptosis. El Proteoma Redox muestra que en las células HepG2 la Trx1 puede tener actividad tanto desnitrosilasa como transnitrosilasa a través de su Cys73 bajo condiciones de nitrosativas.

Con la puesta a punto de la técnica del 'Biotin-Switch' estudiamos el efecto de la sobreexpresión de NOS3 y del silenciamiento de la Trx1 sobre el perfil de nitrosilación de las células HepG2 (Figura 1). Como cabía de esperar, la sobreexpresión de NOS3 provoca un aumento de proteínas nitrosiladas, pero al silenciar la Trx1 vemos cómo hay proteínas más nitrosiladas (flechas azules) y otras menos nitrosiladas (flecha amarilla). Por lo tanto, alguna de nuestras cisteínas que se reducen y otras que se oxidan al silenciar la Trx1, pueden ser sustrato de la actividad desnitrosilante como transnitrosilante de la Trx1. Para validar esta teoría, elegimos algunas de las proteínas dianas que obtuvimos del análisis del Proteoma Redox con Skyline y comprobamos si están nitrosiladas. La Trx1 se encuentra nitrosilada tanto al sobreexpresar la NOS3 como en el control, posiblemente en su Cys73, y ser la responsable de la nitrosilación de la Caspasa-3, pues está menos nitrosilada al silenciar la Trx1. La Piruvato Kinasa 2 (PKM2) se encuentra nitrosilada y se confirmó que es sustrato de la actividad desnitrosilasa de la Trx1.

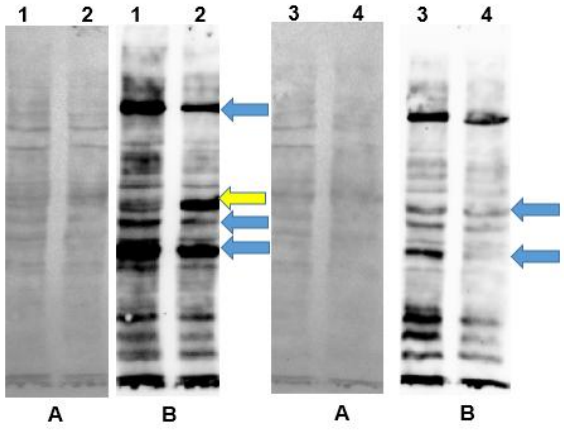


Figura 1. Estudio de proteínas S-Nitrosiladas por "Biotin-Switch": A: ponceau; B: Western blot de proteínas biotiniladas; 1: NOS3 + siRNA Trx1; 2: NOS3 + non-target; 3: Vo + siRNA Trx1; 4: Vo + non-target.

También se está intentando identificar las cisteínas concretas que se encuentran nitrosiladas mediante una modificación de la técnica 'Biotin-Switch', consistente en la digestión de las proteínas biotiniladas y capturadas, y posterior elución y análisis de los péptidos cisteínicos por LC-MS/MS.

El estudio del Proteoma Global de las tres líneas celulares (HepG2, SNU423, y SNU475) nos ha permitido caracterizar las tres líneas mostrando que el 38.66% de las

proteínas identificadas cambian su expresión en alguna de las líneas. El tratamiento con Sorafenib y/o siRNA Trx1 afecta más a la línea SNU475 (33.95% de proteínas diferenciales) que a las células SNU423 (10.78%) y HepG2 (2.55%). Las proteínas diferencialmente expresadas se han analizado con el software Ingenuity Pathway Analysis mostrando un enriquecimiento en proteínas relacionadas con la supervivencia y muerte celular así como proliferación. Aún sigue en curso la identificación del Proteoma Redox con el software 'Skyline'.

Conclusiones

- La técnica 'Biotin-Switch' nos permite identificar con éxito proteínas S-nitrosilada en extractos celulares.
- Los cambios redox detectados en al menos tres proteínas diana se deben a nitrosilación
- El grado de diferenciación de las células de hepatocarcinoma influye significativamente en su respuesta al Sorafenib a nivel del proteoma.

Bibliografía

[1] Ghezzi, P., Bonetto, V. & Fratelli, M., 2005. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox refulation. *Antioxidants & redox signaling*, 7(7-8), 964-972.

[2] Hanschmann, E., Godoy, J., Berndt, C. et al., 2013. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 19(13), 1539-605.

[3] González, R., López-Grueso, MJ., Muntané, J., Bárcena, J., & Padilla, CA., 2015. Redox regulation of metabolic and signaling pathways by thioredoxin and glutaredoxin in NOS-3 overexpressing hepatoblastoma cells. *Redox Biology* 6, 122–134.

[4] McDonagh, B. et al., 2009. Shotgun redox proteomics identifies specifically modified cysteines in key metabolic enzymes under oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae. Journal of proteomics, 72(4), 667-689.

[5] López-Grueso, MJ. et al. (Manuscrito en preparación).

Capítulo 17. Evaluación del riesgo por mercurio a partir del aporte por consumo de pescado en España

Alicia Moreno-Ortega, Rafael Moreno-Rojas y Manuel Ángel Amaro López

Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

Campus de Rabanales, Edificio Darwin. E-mail: t22moora@uco.es

Resumen

Recientemente en España se ha suscitado gran preocupación por el aporte de mercurio a partir del consumo de pescado, pero no se había desarrollado un estudio sobre la evaluación de riesgo probabilístico por mercurio a partir de la ingesta de pescados y mariscos, que es el objetivo de este trabajo. A partir de datos individuales de la encuesta de dieta total de 3000 personas, estimamos su consumo de las principales especies de pescado y marisco (49) y recopilamos datos individualizados (2000) de contenido de mercurio total en ellas, que se completan y validan con datos estadísticos bibliográficos.

Tras estimar las distribuciones de cada especie de pescado y marisco, tanto de consumo por los españoles, como de contenido de mercurio, se realiza una simulación de distribución de ingesta de mercurio a partir del pescado y marisco que nos ofrece un 2.6% de población española en riesgo de exceder las recomendaciones de mercurio total y entre un 12.2% y un 21.2% de que excedan las recomendaciones de metilmercurio. Las principales especies responsables son el atún, el pez espada y la merluza y se identifican diferencias significativas por el consumo de pescado entre sexos y edades, aunque en el porcentaje de riesgo lo más patente es un incremento del mismo al aumentar la edad.

Fundamento

El mercurio es un elemento que podemos encontrar en la naturaleza formando parte de diferentes minerales o bien a raíz de actividades antropogénicas. La principal fuente de exposición al mercurio para la población en general será la ingesta de peces y mariscos [1].

En cuanto a las ingestas tolerables, encontramos diferentes organismos, a nivel internacional, que han ido estableciendo recomendaciones semanales de consumo a lo largo del tiempo, las más actualizadas, y con las que hemos estado trabajando, son la PTWI de WHO (2004)/ EFSA (2006) de 1'6 µg de metilmercurio/kg p.c.; la TWI de la EFSA (2012) de 1'3 µg de metilmercurio/kg p.c.; y la PTWI de JECFA (2006, 2010) de 4 µg de mercurio total/kg p.c. [2].

El objetivo principal del estudio es la evaluación del riesgo probabilístico por mercurio en población española a partir de la ingesta de pescado y marisco.

Metodología

Se procedió a la recopilación de datos de consumo de pescado y marisco en población española, a partir de la encuesta ENIDE (2011) [3]. Se trata de una encuesta realizada a 3000 individuos para una ingesta de 4 días. En esta base de datos, se seleccionaron todos aquellos individuos que habían declarado consumo de pescado y/o marisco, se codificaron las especies consumidas y se les asignó un nombre genérico con el que se pudiese asociar posteriormente el aporte de mercurio. Se estableció la distribución de frecuencia de consumo y se comparó con los datos de MAGRAMA [4] para el año que se realizó la encuesta (2010), encontrándose un alto grado de coincidencia.

Por otro lado, se procedió a la recopilación de datos de contenido de mercurio en especies de pescado y marisco de la colección de datos individuales aportados por el Instituto Español de Oceanografía (2003) [5], que contiene más de 2000 datos de mercurio de 80 especies diferentes, que agrupamos en 48 especies, identificadas con nombre común en la encuesta ENIDE. Se incorporó de otras fuentes bibliográficas aquellas especies de las que se había declarado consumo en la encuesta pero no se tenían datos de mercurio. Ajustamos la distribución de frecuencia de contenido de mercurio para cada especie. Finalmente se comprobó la fiabilidad de los datos bibliográficamente.

Para el cálculo de las distribuciones de frecuencias se utilizó DecisionTools Suite v.7, en su componente específico de análisis de riesgo @Risk. Una vez obtenidas las simulaciones de consumo de cada especie y las de las concentraciones de mercurio en cada especie, se realizó el cruce de simulaciones para obtener las distribuciones del aporte de mercurio a partir de la ingesta de cada especie.

Las recomendaciones venían expresadas en µg/kg p.c./semana, mientras que los aportes mercurio a partir de la ingesta de pescado y marisco se expresaban en µg/día. Por ello fue necesario utilizar un valor de peso corporal, para lo que se emplearon datos aportados por el Instituto Nacional de Estadística [6] a partir de EUROSTAT, que al aparecer también desagregados por grupos de edad y sexo permitirían obtener datos por grupos de población. Además del peso, tuvimos que dividir por 7 para obtener la recomendación diaria.

Resultados

A partir de los cálculos estadísticos realizados y mediante el sumatorio de frecuencias de consumo de cada especie, obtuvimos la distribución de consumo de pescado y marisco en

población española. Se trata de una distribución ligeramente asimétrica, por lo que como estadístico de posición más fiable empleamos la mediana.

Mediante el promedio de las distribuciones de contenido de mercurio en cada especie de consumo se obtuvo la distribución de la concentración de mercurio en el total de especies de pescado y marisco.

Sobre los datos de la encuesta, se realizó la evaluación del efecto que tenían los diferentes factores de clasificación empleados en la encuesta sobre el aporte de mercurio a partir de la ingesta. Se empleó el programa SPSS v.20. El análisis de varianza produjo diferencias estadísticamente significativas debidas a sexo y grupo de edad, pero no por estacionalidad ni ubicación geográfica.

Se realizó la evaluación probabilística del riesgo para la población en general. En primer lugar, se generó un sistema Twister, que permitió observar cuáles son las variables que mayor efecto tenían sobre el aporte de mercurio a partir de la ingesta de pescado y marisco. El Twister indicó que las distribuciones que proporcionan mayor variabilidad y por tanto incrementan la incertidumbre del riesgo, corresponden al consumo de atún y a su contenido de mercurio. Otras dos especies que van a influir en esta variabilidad, tanto en contenido de mercurio como su ingesta por la población española, son el pez espada y la merluza.

Finalmente, para la evaluación probabilística del riesgo para la población española, se llevó a cabo la evaluación de 2 escenarios propuestos por las recomendaciones internacionales anteriormente mencionadas, para mercurio total, a partir de la recomendación de la JECFA y para metilmercurio a partir de las recomendaciones de la EFSA y de la WHO.

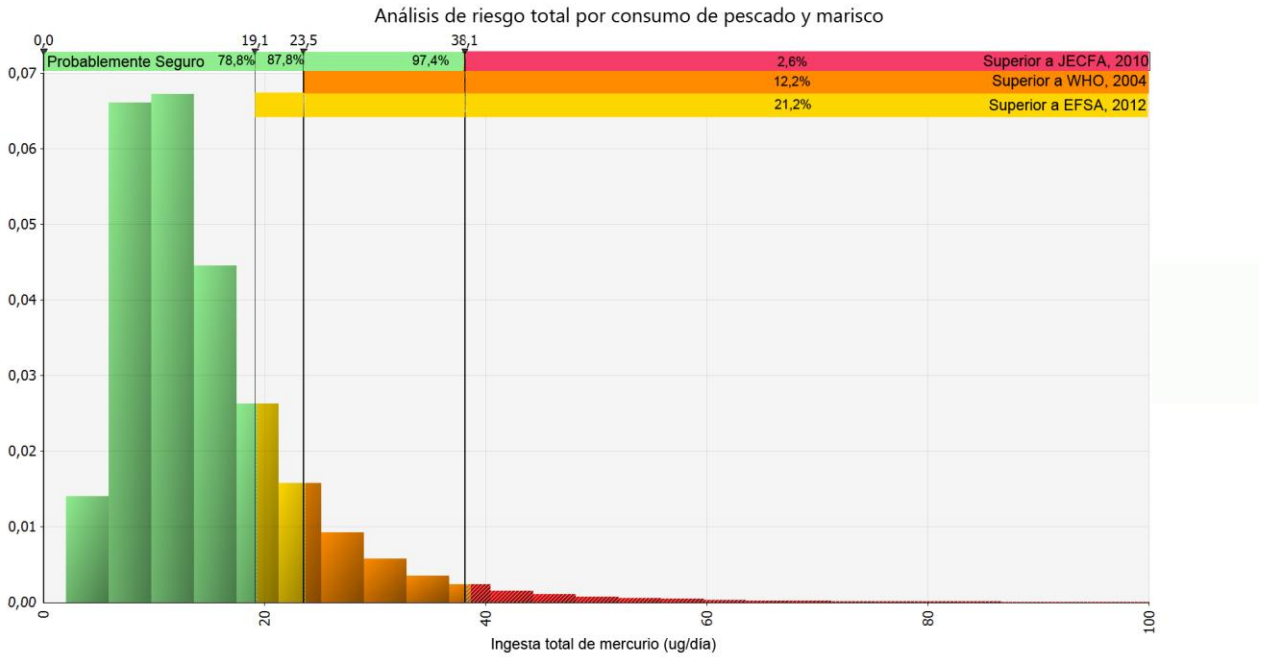


Figura 1. Análisis de riesgo total por consumo de pescado y marisco

En la figura 1 se han representado los diferentes porcentajes de población en riesgo en función de la recomendación internacional usadas. En la tabla 1 encontramos los porcentajes de población en riesgo desagregados por grupos de edad y sexo. La extrapolación de las ingestas tolerables al grupo de edad y sexo, proporcionó el punto de corte que permitía evaluar el porcentaje de población en riesgo para cada recomendación y grupo poblacional.

Tabla 1. Estimación de la población que supera los niveles recomendados de mercurio tolerables, sobre datos estimados por la simulación probabilística

Grupo de población	JECFA 2006, 2010 (Hg)	WHO 2004/EFSA 2006 (M-Hg)	EFSA 2012 (M-Hg)
Total	2.6%	12.2%	21.2%
Hombres	2.5%	12.3%	21.2%
Mujeres	2.4%	12.1%	21.0%
18-24 años	1.9%	8.3%	14.3%
25-44 años	2.6%	12.0%	20.6%
45-64 años	2.9%	14.1%	24.4%

Conclusiones

Como conclusión final se extrajo que el porcentaje de riesgo respecto a mercurio total puede considerarse aceptable, pero no para los que corresponden a las referencias de metilmercurio, por lo que podría ser necesario una revisión de las propuestas.

Bibliografía

[1] E. M. Trasobares Iglesias. Plomo y mercurio en sangre en una población laboral hospitalaria y su relación con factores de exposición (2010). Tesis doctoral del Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

[2] J. S. Sevillano Morales. Metales pesados en especies cinegéticas de caza mayor: estudio epidemiológico y riesgo alimentario (2013). Tesis doctoral del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba.

[3] AECOSAN. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española (ENIDE). Available online at: http://www.aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/datos_consumo/ENIDE.pdf, 2011. [Accessed 3 April 2013].

[4] MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), 2010. http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta10.asp. , [Accessed 22/07/2016].

[5] IEO (Instituto Español de Oceanografía) (2003). Estudio de arsénico y metales pesados en pescados y mariscos de interés comercial.

[6] INE (Instituto Nacional de Estadística) 2001. http://www.ine.es/jaxi/Tabla.htm?path=/t15/p420/a2009/p03/l0/&file=01002.px&L=0. [Consultado el 11/2/2016].

Capítulo 18. Evaluación de distintos protocolos de tinción de ovocitos equinos maduros

Blasa Carmen Pereira Aguilar, Manuel Hidalgo Prieto, Isabel Ortiz Jaraba

Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Grupo AGR-275 Reproducción Veterinaria

Edificio Hospital Clínico Veterinario. Campus de Rabanales.14071-Córdoba. E-mail: v12peagb@uco.es

Resumen

Los avances en las técnicas de criopreservación de ovocitos equinos, supone una ventaja para el desarrollo de la reproducción asistida, importante para la mejora genética y conservación de équidos. Se encuentra muy limitada en comparación con otras especies como el porcino o bovino, donde se emplean técnicas de superovulación eficientemente y no son técnicas tan recientes. Las técnicas de vitrificación previenen de alteraciones estructurales en ovocitos, provocadas por los cristales de hielo que se forman a nivel intracelular. Sin embargo, existen problemas por el aumento de osmolaridad, concentración de crioprotector así como el tiempo de exposición antes de la vitrificación. Además, la existencia de una técnica de tinción adecuada que valore las estructuras morfológicas de los ovocitos, facilita el desarrollo de este campo para valoraciones posteriores de las alteraciones provocadas por los crioprotectores.En este sentido, el objetivo de este estudio fue comparar distintos protocolos de tinción de ovocitos maduros en medios sin crioprotectores, obtenidos a partir de ovarios *post-mortem*. Tras evaluar 9 tinciones con distintos concentraciones de Hoechst 33342, ioduro de propidio y tiempos de incubación, los protocolos 7 ,8 ,y 9 muestran mayor grado de visibilidad con diferencias significativas, coincidiendo su concentración de Hoechst 33342 a 2,5µg/mL en PBS.

Fundamento

El ovocito es un tipo celular rodeado por una zona pelúcida y células del cúmulo, dificultando su crioconservación. En équidos existe una escasa tasa de éxitos en la fecundación *in vitro* estándar, sin metodología que permita la criopreservación comercial de ovocitos. Para avanzar en este campo es necesario un número elevado de ovocitos, motivo por el cual elegimos su obtención a partir de ovarios *post mortem*, disponiendo de un mayor número en comparación con la aspiración transvaginal de folículos preovulatorios. El objetivo de este estudio consiste en evaluar distintas protocolos de tinción de ovocitos equinos madurados *in vitro*, obtenidos a partir de ovarios *post mortem*.

Metodología

Para la recolección de los ovocitos fue necesario trasladarse al matadero, obteniendo ovarios *post mortem* de ocho yeguas sacrificadas en 2016. Tras el sacrificio, los ovarios eran transportados (35-37ºC) durante 1-2 horas hasta su llegada al laboratorio, donde eran procesados a temperatura ambiente y poca luminosidad, empleando guantes de nitrilo, mascarilla, y material estéril (placas Petri, jeringas, agujas, bisturís, curetas óseas Volkmann de varios tamaños, pinzas). Primero se rasparon los folículos, vertiendo el líquido folicular extraído con la jeringa y las células de las granulosa raspadas con la cureta a placas de Petri para su posterior búsqueda de ovocitos en el microscopio estereoscópico SZ51 (Olympus Corporation®, Shinjuku, Tokio, Japón) a 10-20x. Se clasificaron en base a la disposición de las células de la granulosa (compactos y expandidos), y se lavaron en un medio de mantenimiento compuesto de un 90% de M199 con sales de Han's y HEPES con 25µg/mL de gentamicina y un 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco®, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, Estados Unidos). Los ovocitos fueron traspasados a un medio de maduración M199 con sales Earle's y bicarbonato equilibradas al 5% de CO_2, 10% de FBS, 5 mU/mL de hormona foliculoestimulante porcina y 25 µg/mL de gentamicina, mantenidos previamente tres horas al 5% de CO_2. En las placas se colocaron tres gotas (de 75µL) y cubiertas con aceite estéril de cultivo celular se añadieron otros 75 µL de medio. Los ovocitos se traspasaron por las tres gotas para finalizar en la última. Finalmente, maduraron durante 42 horas en un incubador de CO_2 Smart Zell SZ-40 (CIC Controltecnica® instruments, Madrid, España), a 38.2ºC y 5% de CO_2. Para eliminar las células del cúmulo de los ovocitos se denudaron, haciéndolos pasar por pipetas modificadas con disolución de tripsina-EDTA al 25% (Gibco®, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, Estados Unidos) al 1:1 con M199 con sales de Hank's y HEPES.

Las distintas tinciones de ovocitos denudados se realizaron acorde a los siguientes protocolos:

Protocolo 1 [1]: Depositar en 900 µL de Glicerol estéril + 97,5 µL de solución tampón fosfato (PBS) + 2,5 µL del fluorocromo Hoechst 33342 a 1mg/mL. Colocar un cubre objetos.

Protocolo 2 [2]: Colocar en Hoescht 33342 a 10 µL / mL PBS. Incubar 10 minutos a 39ºC. Colocar un cubre objetos para su visualización.

Protocolo 3 [3]: Transferir a 100 µg/mL del fluorocromo Hoechst 33342 en PBS + Ioduro de Propidio a 50 µg/mL PBS. Incubar 10 minutos a 38,7ºC. En este caso no se utilizó la fluoresceína de diacetato que utiliza el autor. Colocar un cubre objetos para su visualización.

Protocolo 4 [4]: Lavar previamente en 100 µL PBS. Colocar en 100 µL PBS + 1% BSA(Suero Fetal Bovino) + 125 µg/mL de ioduro de propidio e incubar 5 minutos a 38,5 ºC.

Pasar a 100 µL de PBS + 90% Glicerol + 100µg/mL Hoechst 33342 e incubar 5 minutos. Lavar 2 veces con PBS.

Protocolo 6: Colocar en Hoechst 33342 a 2,5 µg/mL en PBS + formol. Incubar 10 minutos a 38,5ºC.

Protocolo 7: Pasar los ovocitos a Hoechst 33342 a 2,5 µg/mL en PBS. Incubar 10 minutos a 38,5ºC.

Protocolo 5: Pasar los ovocitos denudados a 100 µg/mL del fluorocromo Hoechst 33342 en PBS + ioduro de propidio a 50 µg/mL PBS. Incubar 10 minutos a 38,5ºC.

Protocolo 8: Colocar en Hoechst 33342 a 2,5 µg/mL en PBS e incubar 5 minutos a 38,5ºC. Pasar a 50 µg/mL de ioduro de propidio en PBS. Incubar 5 minutos a 38,5 ºC.

Protocolo 9: Colocar al ovocito en Hoechst 33342 a 2,5 µg/mL en PBS e incubar 5 minutos a 38,5 ºC. Traspasarlos a 100 µg/mL de ioduro de propidio en PBS e incubar 5 minutos a 38,5ºC.

A partir de una concentración inicial de 2,5µg de Hoechst 33342 (Gibco^{Ġ}, Life Technologies, Inc., Grand Isaland, NY, Estados Unidos) en 1 mL PBS se prepararon las distintas concentraciones de acuerdo a los protocolos a utilizar. El ioduro de propidio (PI, Sigma-Aldrich, Sant Louis, USA) se diluyó en agua desionizada y estéril. Los ovocitos denudados y lavados se incubaron (según el protocolo). Se traspasaron en un volumen de 1-2 µL a un porta objetos depositando alrededor 6.5 µL de la disolución repartidos en tres gotas. En el caso de usar cubre objetos, se les colocó y se fijaron mediante laca de uñas. Todo el proceso debió ser verificado con el microscopio estereoscópico. La visualización de los ovocitos teñidos se llevó a cabo con el microscopio de fluorescencia en campo oscuro (Olympus Corporation^{Ġ}, Shinjuku, Tokio, Japón), usando el filtro U-NU25-2(360-370 nm). Para categorizar los protocolos se establecieron grados de visibilidad (G1= excelente; G2= buena; G3= regular; G4= mala) según permitiera diferenciar: ovocitos que no han madurado con una zona esférica azul en el centro (vesícula germinal), degenerados un punteado azul irregular distribuido por el citoplasma, en metafase I con una placa de metafase (pequeña raya azul) y en metafase II que, además de una placa de metafase, tendrán una zona azul de forma irregular fuera del citoplasma del ovocito pero dentro de su zona pelúcida (ADN del primer corpúsculo polar).

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSSĠ Statistics Server versión 22 (SPSS Institute Inc. Headquarters, Chicago, IL, USA). Los valores medios de los grados de visibilidad de los protocolos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Duncan.

Resultados

Se procesaron un total de 126 folículos de 16 ovarios y 56 ovocitos, de los cuales 19 se perdieron durante las etapas de procesado, maduración y tinción.

Tabla 1. Número de folículos procesados, ovocitos obtenidos y teñidos, tasa de recuperación y fase de maduración.

Nº Folículos procesados	Tasa de recuperación (%)	Nº ovocitos obtenidos	Nº ovocitos teñidos	Fase de maduración (%)			
				No maduros	MI	MII	Degenerados
126	46,67%	56	37	7(18,9%)	9(24,3%)	13(35,1%)	8(21,6%)

MI= Metafase I; MII Metafase II

Los grados de visibilidad mostraron diferencias significativas entre los distintos protocolos (P<0,001), obteniendo los mejores resultados los protocolos 7, 8 y 9 (tabla 2).

Tabla 2. Valoraciones del grado de visibilidad de los distintos protocolos de tinción.

Protocolo de tinción	Nº ovocitos teñidos	Grado de visibilidad				
		G1excelente	G2 buena	G3 regular	G4 mala	Puntuación total
1	3	0	0	1	2	1,33±0,33^{c}
2	5	0	0	0	5	1±0,00^{c}
3	4	0	0	1	3	1,25±0,25^{c}
4	4	0	2	2	0	2,5±0,29^{b}
5	4	0	0	2	2	1,5±0,29^{c}
6	4	0	0	2	1	1,25±0,25^{c}
7	4	3	1	0	0	3,75±0,25^{a}
8	4	3	1	0	0	3,75±0,25^{a}
9	5	2	3	0	0	3,4±0,25^{a}

Puntuación total= (G1x4 + G2x3 + G3x2 + G4x1)/nº ovocitos teñidos. Los valores están expresados en medias ± desviación típica. Las letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre los protocolos (P<0,001).

Conclusiones

En conclusión, los protocolos 7, 8 y 9 muestran mayor grado de visibilidad, coincidiendo en la concentración de Hoechst 33342 a 2,5µg/mL en PBS.

Agradecimientos

A mi directores Manuel Hidalgo Prieto e Isabel Ortiz Jaraba. Al matadero por el aporte de los ovarios y a la "Universidad de Córdoba. I Becas Semillero de Investigación" por brindarme la oportunidad de participar y formarme en el mundo de la investigiación.

Bibliografía

[1] Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. Animal reproduction science. 2008;108:171-9.

[2] Curcio BR, Gastal MO, Pereira GR, Corcini CD, Landim-Alvarenga FC, Barros SS, et al. Ultrastructural Morphology and Nuclear Maturation Rates of Immature Equine Oocytes Vitrified with Different Solutions and Exposure Times. Journal of Equine Veterinary Science. 2014;34:632-40.

[3] de Leon PM, Campos VF, Corcini CD, Santos EC, Rambo G, Lucia T, Jr., et al. Cryopreservation of immature equine oocytes, comparing a solid surface vitrification process with open pulled straws and the use of a synthetic ice blocker. Theriogenology. 2012;77:21-7.

[4] Lagares MA, Castanheira PN, Amaral DC, Vasconcelos AB, Veado JC, Arantes RM, et al. Addition of ficoll and disaccharides to vitrification solutions improve in vitro viability of vitrified equine embryo. Cryo Letters. 2009;30:408-13.

Capítulo 19. Preparación de muestras para plataformas de Next Generation Sequence (NGS)

Juan Carlos Soto Debrán

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Genética.

Campus de Rabanales, Edif. Gregor Mendel, 14071 Córdoba. E-mail: sotodebranjuancarlos@gmail.com

Resumen

Los estudios genéticos en los que se realicen secuenciaciones con plataformas de Next Generation Sequence (NGS) como las que ha desarrollado Ilumina requieren la construcción previa de librerías genéticas. Cuando se trabaja con ADN antiguo proveniente de restos arqueológicos la construcción de estas librerías presenta muchas particularidades y requiere una especial atención a las contaminaciones; en cambio, no es necesario llevar controles tan estrictos cuando el trabajo se realiza con muestras de ADN moderno obtenidas de diferentes tejidos. Para la construcción de librerías previamente se realiza una extracción y purificación de ADN al que se añade los índices gracias a unos adaptadores. Todo el proceso requiere trabajar en un laboratorio especialmente preparado para ello, prestando mucha atención a los diferentes controles, entre ellos los negativos son los que más relevancia presenta ya que nos indican indicios de contaminación. Tras la construcción de las librerías se comprueba y cuantifica mediante geles de agarosa, q-PCR, Nanodrop y Qubit, buscando conocer la cantidad de ADN y la calidad de la muestra. Una vez secuenciadas las librerías los datos serán tratados con programas de bioinformática para posteriormente poder ser estudiados en profundidad. Partiendo del procesamiento de 65 muestras de huesos hemos sintetizado 154 librerías que hemos purificado individualmente y que hemos sometido a un total de 770 PCR.

Fundamento, Metodología, Resultados y Conclusiones

Este trabajo se engloba dentro del proyecto "Patrimonio arqueozoológico de Andalucía: Análisis genético de las interrelaciones culturales y la aplicación a su patrimonio ganadero actual" (HUM-8105) que pertenece a los proyectos de excelencia de la Junta de Andalucía, de la convocatoria por la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia del año 2011; en este contexto es interesante estudiar diversas especies domésticas de gran importancia ganadera de la comunidad autónoma de Andalucía en la actualidad, tales como las cabras, ovejas, jabalís, toros o caballos, y compararlos con muestras de huesos de antecesores de entre el neolítico y la edad media para ver su evolución genética [1]. Pretendemos preparar las muestras para su secuenciación por el CNAG. Los resultados este trabajo son la comprobación de que efectivamente la síntesis de las librerías se ha hecho correctamente, además de los datos que deriven posteriormente de los archivos del servicio de secuenciación del CNAG.

También extraemos muestras recientes de animales actuales que se envían directamente a secuenciar ya que el CNAG prepara esas muestras de forma automática para su secuenciación.

Partiendo del procesamiento de 65 muestras de huesos hemos sintetizado 154 librerías que hemos purificado individualmente y que hemos sometido a un total de 770 PCR, teniendo en cuenta tanto q-PCRs como las PCRs de síntesis, e igualmente hemos cargado todas las librerías en gel, junto a su control negativo y las hemos cuantificado.

Los huesos se pulverizan para después extraer el ADN mediante el método Yang/Urea [2] y después se construyen las librerías para Illumina mediante el protocolo de Cold Spring Harbor [3]. Todo este proceso se lleva a cabo en un laboratorio preparado específicamente que cuenta con un sistema de puertas dobles y flujo de aire cerrado y al que hay que entrar con un mono de cuerpo completo sobre ropa limpia, acompañado de tres pares de guantes y mascarilla con pantalla.

Las librerías se amplifican mediante q-PCR para controlar que se han construido correctamente y para conocer el plateau de cada librería. Por último se les une a cada muestra un index diferente que la identifique, son secuencias de 52 bases que se diferencian en las 7 bases centrales, mediante una PCR convencional. Después comprobamos esta construcción en un gel de agarosa al 2% como el que recoge la Figura 1.

En los geles cada librería (Lib) se acompaña de su control negativo (C-), las bandas que aparecen en esos carriles corresponden a los index; además aparecen los controles que se hicieron en la extracción y que se han tratado como librerías sin banda de amplificación correspondiente a una librería (por ejemplo Lib-22). Para evitar contaminaciones, las reacciones de amplificación y los geles de agarosa se hacen en un laboratorio diferente al laboratorio en el que se trabaja con ADN antiguo.

Una vez construidas las librerías se cuantifican por Nanodrop y Qubit, que van a darnos diferentes datos sobre la calidad de la muestra (cantidad de ADN, contaminación por proteínas, sales) [4].

Nanodrop mide absorbancia sobre una gota de 1 o 2 µL, no permite preparación previa y nos permite conocer, además de la cantidad de ADN, el grado de contaminación por proteínas mediante el cociente Absorbancia 260nm/ Absorbancia 280nm, ya que el ADN tiene el pico a 260nm mientras que las proteínas a 280nm.

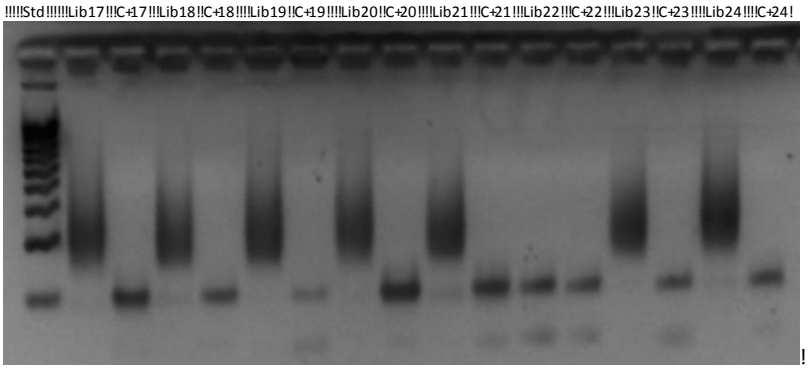


Figura 1. Comprobación en gel de agarosa al 2% de la amplificación de las librerías 17 a 24

Tabla 1. Resultados de la cuantificación en Nanodrop de diversas muestras

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/µL	A260	A280	260/280
CO15_ESC_1_JAB	Default	16/12/2015	17:45	16,08	0,322	0,183	1,76
CO15_ESC_2_JAB	Default	16/12/2015	17:47	3,15	0,063	0,013	4,83
CO15_ZOR_1_JAB	Default	16/12/2015	17:48	13,33	0,267	0,154	1,73
CO15_ZOR_2_JAB	Default	16/12/2015	17:49	5,32	0,106	0,053	2
IBE_4076	Default	16/12/2015	17:51	199,51	3,99	2,122	1,88
IBE_4077	Default	16/12/2015	17:53	165,32	3,306	1,781	1,86
IBE_4078	Default	16/12/2015	17:53	218,09	4,362	2,357	1,85
IBE_4079	Default	16/12/2015	17:54	174,49	3,49	1,857	1,88<

Qubit da una medida más precisa ya que mide fluorescencia sobre una sonda que previamente se debe unir al ADN, siendo una medida mucho más selectiva.

Tras la correcta cuantificación se mandan las librerías a secuenciar por el servicio del CNAG y este nos devuelve dos archivos con extensión ".fast.qz" por cada index, uno en cada sentido de lectura del ADN. Estos archivos se abren con el programa bioinformático FastQC [5] y se les somete a un pretratamiento con programas bioinformáticos como cutadapt [6] para mejorar la calidad de la secuencia que tenemos ya que un error que nos presenta es la sobrerrepresentación de las secuencias de los index, que deberemos eliminar del archivo.

Trabajar con ADN siempre conlleva una especial atención pero preparar muestras de ADN antiguo para secuenciar requiere un trabajo meticuloso y con mucha preparación y numerosas

consideraciones. Hace falta cuidar el diseño de los laboratorios, la organización del tiempo y mantener las estrictas medidas contra las contaminaciones. Las diferencias entre ADN moderno y antiguo permite trabajar con técnicas muy diversas y además nos hace entender que es fundamental tener un buen conocimiento del material con el que se trabaja para poder adecuarnos a las condiciones que requiere y así optimizar el proceso.

Además, gracias a las diversas comprobaciones y cuantificaciones con las diferentes tecnologías que hemos realizado a lo largo del proyecto y a los controles negativos que llevamos, hemos observado que el trabajo cuidadoso ha merecido la pena y hemos podido evitar las contaminaciones y tener una calidad y una cantidad de ADN adecuada para ser secuenciada y que tras el procesamiento por bioinformática necesario nos dará muchísima información de utilidad.

Bibliografía

[1] M. Zeder, E. Emshwiller, B. Smith, D. Bradley, Documenting domestication: the intersection of genetics and archeology. *TRENDS in Genetics*, 22(3), 2006, p. 139-155. doi: 10.1016/j.tig.2006.01.007

[2] D.Y. Yang, B. Eng, J.S Waye, J.C Dudar, S.R. Saunders, Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns, *American Journal of Physical Anthropology* 105, 1998, p. 539–543.

[3] M. Meyer, M. Kircher, Illumina Sequencing library preparation for Highly Multiplexed Target Capture and Sequencing. *Cold Spring Harb Protoc*. doi: 10.1101/pbd.prot5448

[4] Thermo Scientific, Life Technologies, Invitrogen™. Technical Note. Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements. QubitĠ fluorometric quantitation vs. Spectophotometer measurements.

[5] Babraham Bioinformatics. FastQC. Acccesible desde: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

[6] M. Marin, Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal,* 17(1), 10-12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

Capítulo 20. Efectos biológicos de la taurina: ensayos in vivo e in vitro para determinar su potencial quimiopreventivo y protector del ADN

Fernando Valenzuela-Gómez, Marcos Mateo-Fernández, Tania Merinas-Amo, Ángeles Alonso-Moraga

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Genética.

Edificio Gregor Mendel, Campus de Rabanales, 14071-Córdoba. E-mail: fernando94vg@gmail.com

Resumen

La nutrigenómica pone de manifiesto la relación existente entre la nutrición y el genoma para mejorar la salud a través de los hábitos alimenticios. En el presente proyecto se han estudiado mediante modelos *in vitro* e *in vivo* los efectos biológicos de la molécula taurina, compuesto bioactivo sintetizado naturalmente en el hígado y presente en bebidas energéticas mundialmente consumidas, para su evaluación como posible sustancia nutracéutica y confirmar su seguridad alimentaria. Se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad, fragmentación internucleosómica del ADN, cometa y estado de metilación utilizando la línea celular de leucemia humana HL-60. También se realizaron ensayos de toxicidad, antitoxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad y longevidad en el organismo modelo *Drosophila melanogaster*. Los resultados *in vitro* mostraron que la taurina no exhibe actividad citotóxica ni provoca fragmentación internucleosómica, pero sí induce daño genético leve. A ello se suma que hipometiló la secuencia LINE-1 e hipermetiló Sat-α. Los resultados *in vivo* revelaron que la taurina mostró cierto nivel de toxicidad, no fue genotóxica ni modificó significativamente la longevidad. Sin embargo, algunas concentraciones resultaron antitóxicas y antigenotóxicas. Como conclusión, se ha demostrado la seguridad alimentaria de la taurina y sus posibilidades como sustancia nutracéutica.

Fundamento y Metodología

El objetivo de la nutrigenómica consiste en poner de manifiesto la relación existente entre la nutrición y el genoma para mejorar la salud a través de los hábitos alimenticios de manera científica. Una sustancia nutracéutica es aquella que proporciona algún beneficio médico o para la salud, además de no ser tóxica [1].

El compuesto bioactivo Taurina (107-35-7, SIGMA-ALDRICH), sintetizado naturalmente en el hígado y presente en bebidas energéticas mundialmente consumidas, fue seleccionado para la elaboración del presente proyecto para su evaluación como posible sustancia nutracéutica y confirmar su seguridad alimentaria. Para ello, se utilizó la línea celular de leucemia humana HL-60 para llevar a cabo ensayos *in vitro* de citotoxicidad, fragmentación internucleosómica del ADN, ensayo del cometa y de estado de metilación de tres secuencias repetitivas (ALUM1, LINE-M1 y SAT-α) [2]; además se usó *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para realizar ensayos *in vivo* de toxicidad y antitoxicidad, genotoxicidad y antigenotoxicidad y longevidad según el procedimiento habitual en nuestro laboratorio [2,3].

Resultados

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los ensayos *in vivo*. Todas las concentraciones resultaron tóxicas, excepto la mínima, observándose una respuesta dosis-dependiente positiva. Las concentraciones 1 y 2 mM fueron antitóxicas. No hubo diferencias significativas con respecto al control negativo en los ensayos de longevidad y de genotoxicidad. Sin embargo, sí resultó ser antigenotóxica inhibiendo el daño genético inducido por el peróxido de hidrógeno en 38% (32mM) y 70% (1 mM).

En cuanto a los ensayos *in vitro*, TAU no exhibió actividad citotóxica ni aumentó el crecimiento celular con respecto al control a ninguna concentración. Tampoco indujo fragmentación del ADN internucleosomal en células de leucemia humana al no observarse el típico patrón de bandas en escalera en el gel de agarosa que se muestra en la Figura 1.

Tabla 1. Resultados de los ensayos in vivo tratando a D. melanogaster con diferentes concentraciones de TAU.

	TOXICIDAD	ANTITOXICIDAD	LONGEVIDAD
	Supervivencia (%)		Tratamiento Crónico (días)
H_2O	100	100	64.97±2.426
H_2O_2 (0.15 M)	-	38.46	-
0.25	94	40.76	67.94±2.6
1	78*	57.69*	66.81±3.22
2	77*	56.9*	61.8±2.25
8	76*	40	70.14±2.39
32	78*	42.3	66.04±2.05

	GENOTOXICIDAD	ANTIGENOTOXICIDAD	
	Total Spots	Total spots	IP (%)
H_2O	0.195 (8)	0.195 (8)	
H_2O_2 (0.15 M)	0.425 (17)+	0.425 (17)+	
1	0.108 (4)-	0.125 (5)Δ	70.6
32	0.2 (8) λ	0.13 (6)Δ	38.1

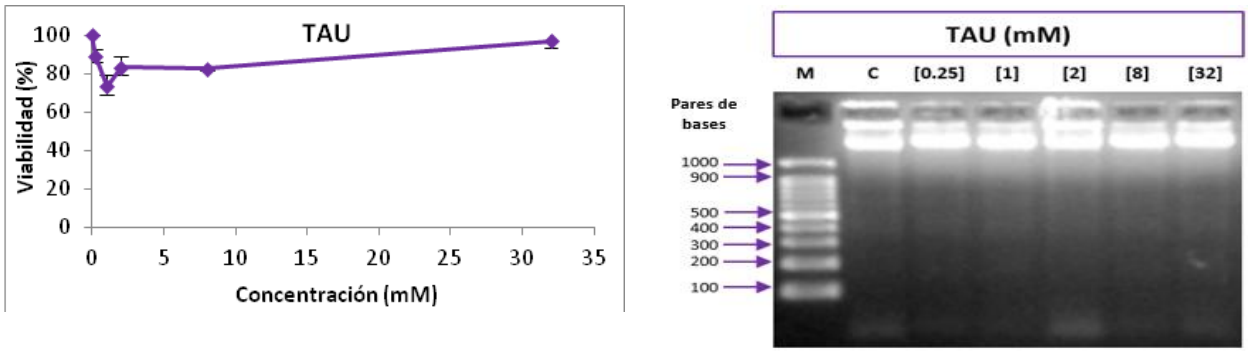


Figura 1. La imagen de la izquierda corresponde al ensayo de citotoxicidad y la de la derecha al ensayo de fragmentación del ADN internucleosomal.

El ensayo del cometa (Tabla 2) se utiliza para evaluar la capacidad de un compuesto de inducir roturas de cadena en la estructura del ADN. Las concentraciones 0,25 mM y 2 mM aumentaron significativamente los valores del parámetro momento de la cola

Tabla 2. Resultados de los ensayos in vitro tratando la línea celular HL-60 con diferentes concentraciones de TAU.

	COMETA	METILACIÓN		
	TM	Expresión Normalizada Relativa		
	(u.a.)	ALUM1	LINE	SAT-α
H_2O	1,1	1	1	1
0.25	2,17**[2]			
1	1,7	0,8	0,84	0,48***
2	2,78***			
32		0,84	0,56**	1,03**

(TM). Aun así, todos los valores fueron menores que 3, induciendo daño genético ligero [7]. En cuanto al ensayo del estado de metilación, TAU indujo hipometilación en LINE-1 a 32 mM. Contrariamente, ambas concentraciones de TAU produjeron hipermetilación en Sat-α mostrando una respuesta dosis-dependiente negativa. Actualmente, las terapias médicas frente al cáncer se centran en agentes hipometilantes globales capaces de inducir la expresión de los genes supresores de oncogenes que están silenciados. De ahí que la hipometilación de la secuencia LINE-1 pueda tener un efecto beneficioso, así como la hipermetilación de la secuencia satélite ensayada, pues se ha comprobado que un silenciamiento génico de esta secuencia en células transformadas tendría un efecto protector [8].

[2] Resultados del ensayo del cometa a la izquierda y del estado de metilación [6] a la derecha mostrando los valores medios de TM y expresión relativa normalizada respectivamente. Los asteriscos indican valores diferentes tras aplicar los tests ANOVA de una vía y post hoc de Tukey: *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001

Conclusiones

En el presente proyecto se ha demostrado la seguridad alimentaria de la taurina al no alcanzar la dosis letal 50 ni inducir mutaciones en *D. melanogaster*. Además, podría ser considerada como una sustancia con cierto potencial nutracéutico al ser antioxidante a bajas concentraciones y proteger frente al daño genético inducido por estrés oxidativo en el modelo *in vivo* y por inducir daño genético en células de leucemia, así como por su beneficiosa modificación del estatus de metilación de secuencias repetitivas.

Bibliografía

[1] J. Anter, Z. Fernández-Bedmar, M. Villatoro-Pulido *et al*., A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis inducing properties of olive-leaf extracts, *Mutat. Res*., 2011, p. 165–170.

[2] M. Mateo-Fernández, T. Merinas-Amo, M. Moreno-Millán, A. Alonso-Moraga, S. Demyda-Peyrás, *In vivo and in vitro* genotoxic and epigenetic effects of two types of cola beverages and caffeine: a multiassay approach, *BioMed. Res. Inter*., 2016, pp.15.

[3] Z. Fernandez-Bedmar, J. Anter, S. de La Cruz-Ares, A. Munoz-Serrano, A. Alonso-Moraga, and J. Perez-Guisado, Role of citrus juices and distinctive components in the modulation of degenerative processes: genotoxicity, antigenotoxicity, cytotoxicity, and longevity in *Drosophila*, *J. Tox. Env. Health A*, 2011, p. 1052–1066.

[4] U. Graf, F. E. Wurgler, and A. J. Katz, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster, Environ. Mutagen*., 1984, p. 153–188.

[5] S. K. Abraham and S. P. Singh, Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee, *Food Chem. Toxicol*., 1999, p. 733–739.

[6] G. Nikolaidis, O. Y. Raji, S. Markopoulou et al., DNA methylation biomarkers offer improved diagnostic efficiency in lung cancer, *Cancer Res.*, 2012, p. 5692–5701.

[7] R. Fabiani, P. Rosignoli, A. De Bartolomeo, R. Fuccelli, and G. Morozzi, Genotoxicity of alkene epoxides in human peripheral blood mononuclear cells and HL60 leukaemia cells evaluated with the comet assay, *Mutat. Res.*, 2012, p. 1–6.

[8] D. T. Ting, D. Lipson, S. Paul et al., Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers, *Science*, 2011, pp. 593–596.

Capítulo 21. Detección y localización inmunohistoquímica del receptor de leptina en la glándula paratiroides de ratas

Ángela Vidal, Ana I. Raya, Carmen Pineda, Ignacio López

Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria. Departamento de Medicina y Cirugía Animal.

Dpto Medicina y Cirugía Animal. Campus Rabanales. Ctra Madrid Cádiz km 396. 14014 Córdoba. E-mail: angelavidal91@gmail.com

Resumen

La glándula paratiroides es una glándula endocrina involucrada en la homeostasis del calcio mediante la producción de parathormona (PTH). La relación existente entre niveles de leptina y PTH en obesidad e hiperparatiroidismo sugiere la presencia de receptores de leptina en la glándula paratiroides. La leptina es una adipoquina cuya función principal es la regulación del metabolismo energético. Su receptor se encuentra en diferentes órganos, entre ellos hipotálamo y cerebelo. El objetivo de este estudio fue demostrar la presencia y localización del receptor de leptina en la glándula paratiroides. Se utilizaron muestras de glándula paratiroides procedentes de dos ratas Zucker. Las muestras se fijaron y procesaron para realización de inmunohistoquímica indirecta. Se emplearon muestras de cerebro y cerebelo como controles positivos y se establecieron controles negativos para todos los tejidos. El receptor de leptina manifestó inmuno-reacción positiva en el citoplasma de las células principales de la glándula paratiroides. Estos resultados ponen de manifiesto una relación directa entre leptina y parathormona y sugieren la existencia de una conexión entre metabolismo energético y mineral. El desarrollo de hiperparatiroidismo en estatus crónico de obesidad, teniendo en cuenta estos resultados, podría explicarse por la acción de la leptina sobre sus receptores en la glándula paratiroides.

Fundamento

La glándula paratiroides es el principal órgano endocrino encargado de regular los niveles de calcio en sangre gracias a la producción de parathormona (PTH) [1]. Por otro lado, la leptina es una citoquina derivada de los adipocitos cuya función principal es la regulación del metabolismo energético inhibiendo el centro del apetito en el hipotálamo [2,3].

Diferentes publicaciones respaldan la asociación entre leptina y PTH, impulsando al estudio de la leptina como factor importante en el desarrollo de hiperparatiroidismo primario [2,4,5,6]. Se admite la existencia de una asociación entre el aumento del peso corporal previo al desarrollo de hiperparatiroidismo siendo, además, la obesidad un factor desencadenante de hipercalcemia en estos pacientes [4]. En este sentido, cuando a estos pacientes hiperparatiroideos se les realiza paratiroidectomía no sólo se corrigen los niveles de calcio sino también disminuyen los de leptina [5]. En una situación similar, en pacientes obesos se ha observado una mayor predisposición al desarrollo de hiperparatiroidismo secundario al estatus de obesidad [4]. Además en pacientes obesos a los que se les hacía cirugía bariátrica se reducía la PTH [7].

Otros autores han observado que en ratones de fenotipo obeso, la propia obesidad puede actuar como factor protector frente a la osteoporosis ya que existe una correlación positiva entre el aumento del peso y grasa corporal sobre la densidad mineral de los huesos [8]. Sin embargo, en la misma línea de investigación, otros autores observaron que la densidad mineral ósea se mantenía en ratas normales cuando se les administraba leptina vía subcutánea a pesar de producirse un descenso en el peso de los animales [9].

Metodología

Se utilizaron cortes histológicos de 4 µm de grosor procedentes de cerebro, cerebelo, hipófisis y glándula paratiroides de dos ratas tipo Zucker de fenotipo delgado para la realización de este estudio. Estos cortes se montaron en portaobjetos con poli-L-lisina y posteriormente se llevó a cabo sobre ellos la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa. Se reservó siempre una preparación de cada tejido como control negativo.

Las preparaciones se desparafinaron con xilol y posteriormente fueron rehidratadas en una escala descendente de alcoholes. Con el fin de evitar tinciones de fondo inespecíficas se llevó a cabo la inhibición de la peroxidasa endógena con una solución al 0,3% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en metanol, donde las muestras estuvieron sumergidas cuarenta y cinco minutos sobre un agitador magnético. Las preparaciones hidratadas, se introdujeron diez minutos en una cuna con una solución de tampón fosfato salino (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) y posteriormente se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico con una solución de ácido cítrico 10 mM a pH 6 en la que se sumergieron y calentaron a una temperatura cercana a la ebullición en tres ciclos de cinco minutos, como ya describieron Dall'Aglio *et al* en 2015 [10]. Terminado el pretratamiento todas las preparaciones fueron incubadas durante treinta minutos, a temperatura ambiente y en cámara húmeda, con suero normal de pollo al 1%. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo anti-ObR policlonal de cabra (sc-1834, Santa Cruz Biotechnology) a concentración 1:30 durante dieciocho horas en cámara húmeda a una temperatura de 4ºC. Incubado el anticuerpo primario se añadió el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra hecho en pollo (sc-2894, Santa Cruz Biotechnology; 1:200), que se mantuvo en cámara húmeda durante treinta minutos y a temperatura ambiente; tiempo tras el cual se procedió al tratamiento con el complejo avidina-biotina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories) durante una hora a temperatura ambiente también en cámara húmeda. Finalmente el revelado de las preparaciones se hizo con el

cromóforo NovaRED (NovaRED Peroxidase Kit - Vector Laboratories) durante tres minutos seguido de tres lavados de cinco minutos con agua destilada y tinción con hematoxilina. Las preparaciones se introdujeron en una solución de carbonato de litio para un mejor contrastado y se aclararon con agua destilada antes de proceder a la deshidratación en una escala ascendente de alcoholes, montaje y observación al microscopio óptico.

Resultados

La ejecución de la puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica resultó en una inmunorreactividad muy marcada en las preparaciones de cerebro y cerebelo. En cerebro, los cuerpos neuronales y prolongaciones dendríticas manifestaron la presencia del receptor de leptina (ObR). De la misma forma se manifestó en la sustancia blanca cerebelosa. Además, el receptor de leptina también mostró inmunorreactividad marcada en las células estrelladas de la capa granular así como en las células de Purkinje de la corteza cerebelosa.

También se encontró expresión del receptor de leptina en la hipófisis, tanto en las membranas como en el citoplasma de diferentes líneas celulares de la adenohipófisis.

En las preparaciones de glándula paratiroides, la inmunorreactividad al receptor de leptina se evidenció en el citoplasma de la mayoría de las células principales del parénquima en todas las muestras de ambas ratas utilizadas para el estudio (Figura 1a). Ninguna de las muestras de paratiroides tratadas como control negativo manifestó el receptor en las células principales (Figura 1b), lo que verifica la validez de la técnica.

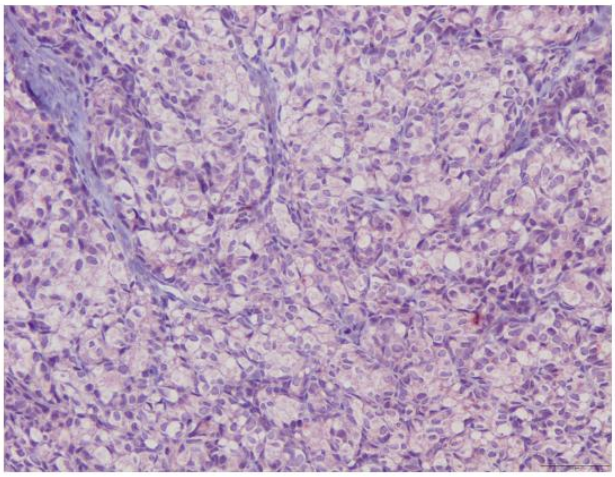


Figura 1a. Glándula paratiroides (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Manifestación del receptor de leptina (punteado rojizo) en el citoplasma de las células principales empleando anticuerpo policlonal de cabra (sc-1834; 1:30) y ácido cítrico.

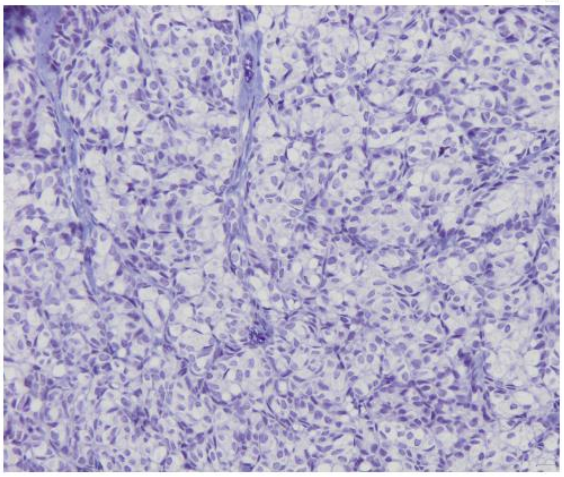


Figura 1b. Glándula paratiroides (20x). Tinción inmunohistoquímica con la técnica del ABC. Control negativo sin inmuno-reacción al receptor de leptina.

Conclusiones

Este estudio demuestra la presencia de receptores específicos de leptina en la glándula paratiroides, así como su localización en el citoplasma de las células principales que la conforman.

Este hallazgo permite dar una base científica a diferentes hipótesis existentes en la bibliografía que intentaban conectar el metabolismo energético y el metabolismo mineral, demostrando la existencia de un eje de acción directo entre leptina y hormona paratiroidea. En

este sentido se comprueba que la relación directa entre leptina y PTH no sólo se debe a la existencia de receptores de parathormona en los adipocitos sino también a la presencia de receptores de leptina en la glándula paratiroides. Además, permite confirmar que la hiperleptinemia encontrada en pacientes obesos podría dar lugar a la interacción de la leptina con sus receptores en paratiroides estimulando la secreción de PTH con el consecuente desarrollo de hiperparatiroidismo.

Bibliografía

[1] C.C. Capen and T.J. Rosol. Recent advances in the structure and function of the parathyroid gland in animals and the effects of xenobiotics. *Toxicol Pathol.* 17 (1989) 333-45.

[2] S.P. Cheng, G.M. Doherty, Y.C. Chang, C.L. Liu. Leptin: the link between overweight and primary hyperparathyroidism?. *Med Hypotheses.* 76 (2011) 94-6.

[3] J.D. Patel & I.S. Ebenezer. The effect of intraperitoneal administration of leptin on short-term food intake in rats. *Eur J Pharmacol*. 580 (2008) 143-152.

[4] M.J. Bolland A.B. Grey, G.D. Gamble, I.R. Reid. Association between primary hyperparathyroidism and increased body weight: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (2005) 1525-30.

[5] D. Hoang, Niclas Broer, A. Sanziana, Roman, Xiaopan Yao, Nathalie Abitbol, Fangyong Li, Julie A. Sosa, Gloria R. Sue, Andrew T. DeWan, Ma-Li Wong, Julio Licinio, Christine Simpson, Alexander Y. Li, Nicole Pizzoferrato, Deepak Narayan. Leptin Signaling and Hyperparathyroidism: Clinical and Genetic Associations. *J Am Coll Surg*. 218 (2014) 1239-1250.

[6] A. Taniguchi, K. Kataoka, T. Kono, F. Oseko, H. Okuda, I. Nagata, H. Imura. Parathyroid hormone-induced lipolysis in human adipose tissue. *J Lipid Res*. 28 (1987) 490-4.

[7] E. Grethen, K.M. Hill, R. Jones, B.M. Cacucci, C.E. Gupta, A. Acton, R.V. Considine & M. Peacock. Serum leptin, parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D, fibroblast growth factor 23, bone alkaline phosphatase, and sclerostin relationships in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 97 (2012) 1655-1662.

[8] A. Matsunuma, T. Kawane, T. Maeda, S. Hamada, N. Horiuchi. Leptin corrects increased gene expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1-alpha-hydroxylase and -24-hydroxylase in leptin-deficient, ob/ob mice. *Endocrinology*. Marzo 145 (2004) 1367-75.

[9] A.K. Stunes, I. Westbroek, J.O. Gordeladze, B.I. Gustafsson, J.E. Reseland, U. Syversen. Systemic leptin administration in supraphysiological doses maintains bone mineral density and mechanical strength despite significant weight loss. *Endocrinology*. Mayo 153 (2012) 2245-53.

[10] C. Dall'Aglio, C. Bazzucchi, F. Mercati, P. Ceccarelli P. Presence and distribution of leptin and its receptor in the minor salivary glands of the donkey. *Acta Histochemica.* 117 (2015) 305–308.

Ciencias Exactas y Naturales

Capítulo 22. Preparación de nanomateriales híbridos quirales y su aplicación a la resolución de mezclas racémicas

J. Amaro-Gahete. D. Esquivel. M.I. López. D. Cosano. J.R. Ruiz. C. Jiménez-Sanchidrián y F. J. Romero-Salguero

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Orgánica. Grupo FQM-346: Catálisis Orgánica y Materiales Nanoestructurados.

Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie (C-3). Crta. Nacional IV-A, km. 396. 14014-Córdoba. E-mail: q22amgaj@uco.es

Resumen

La estereoquímica se define como el estudio de la estructura tridimensional de las moléculas. Un tipo particular de estereoisómeros de gran importancia en Química son los enantiómeros, esto es, compuestos que tienen idéntica conectividad entre sus átomos pero que difieren en su disposición espacial, siendo imágenes especulares entre sí. La importancia de obtener selectivamente uno de los enantiómeros radica en que uno de ellos puede poseer efectos biológicos beneficiosos (eutómero) mientras que el otro puede ser perjudicial (distómero) [1]. La síntesis de materiales híbridos sólidos quirales (por ejemplo, los MOFs, metal organic frameworks) es de enorme interés científico para la obtención de sustancias enantiopuras a partir de racémicos que son de gran importancia en la industria farmacoquímica, agroalimentaria o cosmética [2]. Estos poseen una parte inorgánica y otra orgánica. La primera les otorga rigidez y estabilidad, mientras que la segunda mejora su interacción con moléculas orgánicas. En esta investigación se ha utilizado un producto natural quiral, el ácido tartárico, como ligando orgánico capaz de coordinar cationes metálicos [3]. El objetivo de este trabajo será preparar diferentes polímeros quirales, caracterizarlos mediante diferentes técnicas y evaluarlos en la separación enantioselectiva de 1-feniletanol e ibuprofeno y como catalizadores en la reacción de oxidación de tioanisol.

Fundamento

La síntesis de materiales híbridos sólidos quirales (MOFs, Metal Organic Frameworks [4]) es actualmente de enorme interés científico y práctico para la separación de enantiómeros.

Con el fin de optimizar las diferentes variables de síntesis que afectan en el proceso de formación de estos materiales, se han llevado a cabo diferentes métodos de síntesis. Para ello, se ha elegido un ligando espaciador común, el ácido tereftálico [5], y diferentes productos naturales quirales sencillos (ácido tartárico, ácido glucónico y ácido palmítico). Se han empleado diferentes sales metálicas de hierro, zinc, zirconio, cobre y aluminio, así como diferentes solventes (agua, etanol y dimetilformamida). Asimismo se han variado las relaciones molares entre los diferentes componentes de la mezcla, la temperatura y el tiempo de reacción.

Metodología y Resultados

Después de haber variado los diferentes factores que influyen en la estructura de la red metal-orgánica se han podido determinar las condiciones más óptimas de síntesis. Así, para llevar a cabo el resto de la investigación se han utilizado dos sólidos formados por dos tipos de ligandos orgánicos: un ligando orgánico rígido para aumentar el tamaño de poro, en nuestro caso ácido tereftálico, y un ligando quiral, el ácido tartárico (que procede de la uva) que posee un carbono asimétrico, confiriéndole su carácter quiral [3]. Como centros metálicos se han usado el Fe^{3+} y el Zn^{2+} y como disolvente dimetilformamida [5]. La nomenclatura utilizada es la siguiente: Tart-Tereft-Fe-DMF y Tart-Tereft-Zn-DMF. Una vez que se obtuvieron los materiales sólidos se procedió a su caracterización utilizando diferentes técnicas:

- La caracterización estructural se llevó a cabo mediante difracción de rayos X, técnica empleada para determinar la cristalinidad de los polímeros. Ambos materiales presentaron una buena cristalinidad, ya que obtenemos picos en los difractogramas que indican que poseen planos cristalinos en la red metal-orgánica que orientan los rayos en una determinada dirección y ángulo. En un futuro, la estructura cristalina de ambos polímeros será estudiada mediante la técnica denominada difracción de rayos X de monocristal (Single-Cristal X Ray-Diffraction). En la *Ilustración 1* se muestra el difractograma correspondiente al material Tart-Teref-Zn-DMF.

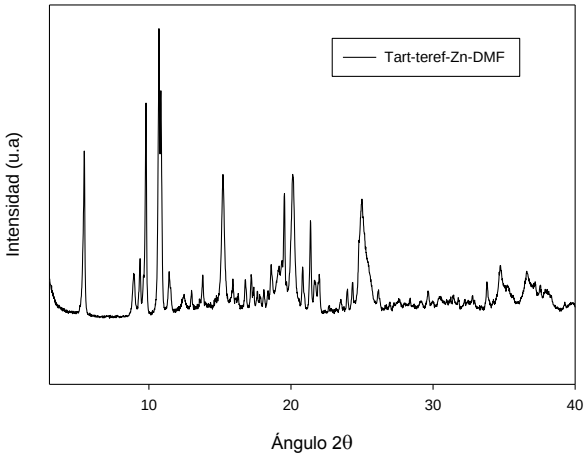


Ilustración 1: Difractograma de rayos X del MOF Tart-Teref-Zn-DMF.

- La caracterización textural se llevó a cabo mediante porosimetría de adsorción-desorción de nitrógeno. Se obtuvieron isotermas tipo I las cuales se caracterizan por

producirse a presiones relativas bajas siendo características de sólidos microporosos. Ambos materiales presentaron un área superficial moderada; de 130 m^2g^{-1} para el polímero Tart-Teref-Zn-DMF y 340 m^2g^{-1} para Tart-Teref-Fe-DMF.

- La caracterización de los componentes presentes en los materiales se llevó a cabo mediante dos técnicas:

    - Espectroscopía Raman: En los espectros Raman de los dos MOFs se puede apreciar la banda de tensión del =C-H (aromático) a un número de onda por encima de 3000 cm^{-1} que indica la presencia de ácido tereftálico en la red. Asimismo, se puede observar un pico de baja intensidad por debajo de 3000 cm^{-1} que da evidencias de que existe parte hidrocarbonada coordinada en el material, la cual proviene de los carbonos sp^3 del ácido tartárico. En la *Ilustración 2* vemos el espectro correspondiente al material Tart-Teref-Zn-DMF, similar al obtenido para el polímero Tart-Teref-Fe-DMF.

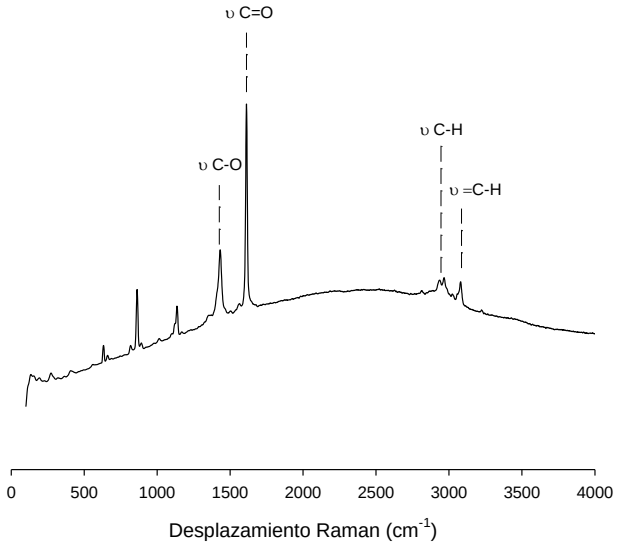


Ilustración 2. Espectro Raman del MOF Tart-Teref-Zn-DMF.

    - Resonancia Magnética Nuclear del ^{13}C: Esta técnica se ha aplicado solamente al MOF de Zn (diamagnético). Los resultados extraídos corroboran los ya obtenidos por espectroscopia Raman, demostrando así que el ligando quiral y el espaciador se ha incorporado en la red metal-orgánica.

Los materiales Tart-Teref-Fe-DMF y Tart-Teref-Zn-DMF se emplearon en la adsorción enantioselectiva de una mezcla racémica de 1-feniletanol y otra de ibuprofeno [5]. Los resultados obtenidos mostraron que no existe adsorción de 1-feniletanol o ibuprofeno en ninguno de los materiales sintetizados. En estudios posteriores se realizará una activación del material para eliminar moléculas de disolvente (DMF) enlazada a los centros metálicos, así como la evaluación de diferentes tipos de solvente con el objetivo de mejorar la adsorción.

Con respecto a la actividad catalítica, el material Tart-Teref-Zn-DMF fue activo en la reacción de oxidación de tioanisol, dando una conversión al producto metilfenilsulfóxido del 6.5 % y a la metilfenilsulfona del 1.2 %. Estos valores tan bajos de conversión nos indican que las condiciones empleadas en la reacción catalítica no fueron las más óptimas. En

estudios posteriores se llevará a cabo una optimización de las variables de reacción, tales como, agente oxidante, temperatura, solvente y cantidad de centros metálicos. La mezcla de reacción fue inyectada en el cromatógrafo de gases con columna quiral para evaluar el exceso enantiomérico (ee%). Bajo las condiciones empleadas no fue posible la separación de los enantiómeros del producto fenilmetilsulfóxido lo que indica que el tipo de columna empleada no es la adecuada para la resolución quiral.

Conclusiones

En este trabajo de iniciación a la investigación sobre los polímeros de coordinación quirales se puede concluir que:

- Se han obtenido estructuras metal-orgánicas utilizando ácido tartárico y ácido tereftálico como ligandos orgánicos y zinc y hierro como cationes metálicos.
- En condiciones óptimas, dos de los MOFs sintetizados son cristalinos, presentan un ordenamiento y estructura definida que será determinada en un futuro mediante la técnica denominada difracción de rayos X de monocristal (single-cristal X ray-diffraction).
- Los materiales sintetizados presentan un área superficial moderada, entre 130 y 340 m^2g^{-1}. La coordinación de ambos ligandos orgánicos al centro metálico se confirmó por espectrometría Raman y Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C.
- No se mostraron evidencias en la adsorción del 1-feniletanol e ibuprofeno para ninguno de los materiales empleados.
- El polímero Tart-Teref-Zn-DMF mostró actividad catalítica en la reacción de oxidación de tioanisol con agua oxigenada, dando como productos el fenilmetilsulfóxido y la fenilmetilsulfona.

Bibliografía

[1] R. Bueno-Perez, A. Martin-Calvo, P. Gómez-Álvarez, J. J. Gutiérrez-Sevillano, P. J. Merkling, T. J. Vlugt, T. S. van Erp, D. Dubbeldam and S. Calero, *Chemical Communications*, 2014, 50, 10849-10852.

[2] Y. Peng, T. Gong, K. Zhang, X. Lin, Y. Liu, J. Jiang and Y. Cui, *Nature communications*, 2014, 5.

[3] V. Schurig, *Journal of Chromatography A*, 2001, 906, 275-299.

[4] O. M. Yaghi, M. O'Keeffe, N. W. Ockwig, H. K. Chae, M. Eddaoudi and J. Kim, *Nature*, 2003, 423, 705-714.

[5] Horcajada, C. Serre, G. Maurin, N. A. Ramsahye, F. Balas, M. Vallet-Regi, M. Sebban, F. Taulelle and G. Férey, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130, 6774-6780.

Capítulo 23. Estudio de la asimilación de cianuro por la bacteria alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Miguel Ángel Aparicio-Jiménez, Victor M. Luque-Almagro, Conrado Moreno-Vivián, Mª Dolores Roldán Ruiz

Universidad de Córdoba. Escuela de postgrado. Departamento de Bioquímica.

Campus de Rabanales s/n, Edificio Severo Ochoa, primera planta. E-mail: a02apjim@uco.es

Resumen

Los residuos cianurados procedentes de la industria joyera implican un serio problema de contaminación medioambiental. El uso de microorganismos cianotrofos se propone en la actualidad como una alternativa favorable a los tratamientos físico-químicos para eliminar cianuro de zonas contaminadas. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria que presenta un gran potencial en cuanto a la eliminación de cianuro ya que es capaz de asimilar cianuro y compuestos cianoderivados. En este trabajo se ha llevado a cabo una caracterización fisiológica de estirpes mutantes deficientes en algunos genes *nit* de la estirpe CECT5344 afectados en la asimilación de cianuro, así como el desarrollo de la técnica BN-PAGE (Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) con el fin de buscar complejos proteicos reprimidos o inducidos por cianuro. Los resultados obtenidos mostraron que todos los genes estudiados en este trabajo son esenciales para la asimilación de cianuro. Además, la presencia de cianuro en el medio provoca tanto inducción como represión de proteínas y de complejos proteicos en la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Fundamentos

El cianuro es una molécula que contiene un átomo de carbono y un átomo de nitrógeno unidos por un triple enlace. Este compuesto se puede presentar en forma protonada, como ácido cianhídrico (HCN), como anión (CN^-), constituyendo sales (NaCN y KCN), complejos metálicos débiles, moderadamente fuertes o fuertes, así como nitrilos [1].

Aunque existen organismos capaces de producir cianuro, son las diversas actividades industriales las que originan grandes cantidades de cianuro, causando problemas de contaminación ambiental. Principalmente la minería y joyería son las industrias que generan residuos [1]. La descontaminación de estos residuos cianurados se lleva a cabo empleando métodos físico-químicos, que generan compuestos también tóxicos. Como alternativa a estos métodos se plantea el uso de microorganismos tolerantes al cianuro y capaces de utilizarlo como fuente de nitrógeno. Con el fin de evitar la producción de ácido cianhídrico durante este proceso es imprescindible la utilización de condiciones alcalinas y el uso de microorganismos alcalófilos, ya que el pK_a del HCN es 9,2 [2].

Una de las estirpes bacterianas más estudiadas en relación con la capacidad de degradar cianuro es *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, aislada del río Guadalquivir a su paso por Córdoba. Su gran potencial en este proceso radica en que posee un crecimiento óptimo a pH alcalino y que tolera elevadas concentraciones de cianuro (hasta 30 mM). La asimilación de cianuro en esta estirpe se lleva a cabo a través de la formación de un nitrilo como intermediario. En esta ruta participa una malato-quinona:oxidorreductasa que genera oxalacetato, el cual reacciona con el cianuro formando un 2-hidroxinitrilo. Este nitrilo es posteriormente convertido en amonio y el ácido carboxílico correspondiente por la acción de la nitrilasa NitC, cuyo gen forma parte de la agrupación génica *nit1C* (Fig. 1) [3-5].

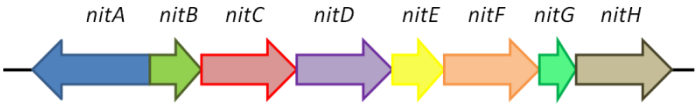


Figura 1. Agrupación génica: nit1C de P. pseudoalcaligenes CECT5344. Dicha agrupación génica presenta un tamaño de 7, 8 kb y está constituida por nitA, regulador transcripcional; nitB y nitG, de función desconocida; nitC, nitrilasa; nitD, miembro de la superfamilia S-adenosilmetionina; NitE, miembro de la superfamilia N-acetiltransferasa; nitF, implicado en la síntesis de novo de purinas y nitH, cuyo producto es una oxidorreductasa-NADPH.

Los objetivos de este trabajo han sido la realización de una caracterización fisiológica de mutantes de la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 afectados en algunos genes de la agrupación génica *nit1C* responsable de la asimilación de cianuro, y la identificación de proteínas o de complejos proteicos en condiciones cianotróficas mediante la técnica BN-PAGE (Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

Métodos

Como material biológico se utilizaron las estirpes silvestre y mutantes *nitA*$^-$, *nitC*$^-$ y *nitD*$^-$ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Las estirpes se cultivaron en medio mínimo M9 en condiciones aeróbicas, a 30ºC y en agitación constante, variando la fuente de nitrógeno dependiendo del experimento. Para determinados ensayos, las células se recogieron mediante centrifugación a 20.000 g durante 10 minutos.

Se realizaron medidas del crecimiento celular mediante la determinación de la absorbancia del cultivo a 600 nm (A_{600}), o bien determinando la concentración de proteína en células enteras mediante el método de Lowry [6]. Para determinar la concentración de amonio se utilizaron los métodos previamente descritos por Morrison [7] y Solorzano [8]. Para la determinación de cianuro se utilizó un método colorimétrico previamente descrito [9].

La actividad nitrilasa se ensayó en células enteras cultivadas previamente con cianuro 2 mM o con amonio 2 mM (como control). Se recogieron mediante centrifugación y se concentraron en tampón fosfato ajustando la A_{600} a 1,7. El ensayo, conteniendo la suspensión celular y 100 mM de glutaronitrilo se incubó 30ºC durante 30 minutos, determinándose el amonio formado según el método de Solorzano [8].

Para el análisis de proteínas o complejos proteicos se ha optimizado la técnica BN-PAGE. Para ello se realizó una separación de proteínas en condiciones nativas usando un gradiente de poliacrilamida (7%-15%), donde se sustituyó el SDS por Coomassie blue G250. Posteriormente, las proteínas se separaron en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes según los protocolos convencionales en presencia de SDS. Las manchas o "spots" de interés se recortaron e identificaron mediante MALDI-TOF/TOF en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI).

Resultados y Conclusiones

Para la caracterización fisiológica de las estirpes silvestre y mutantes *nitA*$^-$, *nitC*$^-$ *y nitD*$^-$ *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se utilizó cianuro como única fuente de nitrógeno, o bien amonio como una fuente alternativa de nitrógeno (control). Los mutantes *nitA*$^-$ y *nitD*$^-$ crecieron en medios con cianuro, aunque menos que la estirpe silvestre, mientras que el mutante *nitC*$^-$ apenas creció con cianuro. Sin embargo, todos los mutantes *nit* crecieron en amonio de forma similar a la estirpe silvestre. Respecto al consumo de cianuro, se observó que la estirpe silvestre consumía cianuro más rápidamente que los mutantes *nitA*$^-$ *nitC*$^-$ y *nitD*$^-$.

En el caso de la actividad nitrilasa, todos los mutantes presentaron una actividad basal en medios con amonio o cianuro mientras que en la estirpe silvestre, la actividad nitrilasa en medios con cianuro fue muy superior a la presente en medios con amonio y a la que presentaron los mutantes. La actividad nitrilasa basal de los mutantes cultivados con cianuro o la de la estirpe silvestre cultivada con amonio puede deberse a que la estirpe CECT5344 presenta, además de NitC, otras tres nitrilasas que se podrían expresar de forma basal en presencia de cianuro.

En relación con el segundo objetivo de este proyecto, utilizando la técnica BN-PAGE se han detectado ocho manchas inducidas por cianuro y dos manchas reprimidas por este compuesto, utilizando células cultivadas en amonio 2 mM como control. Todos los spots se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en el Servicio Central de Ayuda a la Investigación de la Universidad de Córdoba. Las proteínas inducidas por cianuro fueron la subunidad B de la piruvato carboxilasa, la dihidrodipicolinato sintasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la fosfoenolpiruvato sintasa, una oxidasa multicobre, una chaperona DnaK, una beta-alanina-piruvato transaminasa y un fragmento de una peptidasa S45 (penicilina amidasa). Las proteínas reprimidas por cianuro fueron la malato sintasa junto con una proteína de resistencia a cobre de la familia CopA. De todas estas proteínas, dos de ellas aparecieron alineadas en cianuro, posiblemente tratándose de un complejo: la fosfoenolpiruvato sintasa y la chaperona DnaK. En las muestras cultivadas: la malato sintasa y la proteína de resistencia a

cobre aparecieron alineadas, aunque la función de ambas proteínas no parece indicar que se trate de un complejo.

Las conclusiones que se extraen de estos resultados son las siguientes: 1) los genes *nitA, nitC y nitD* resultan esenciales para la asimilación de cianuro en la estirpe CECT5344. 2) El análisis mediante BN-PAGE ha permitido la identificación de 8 proteínas inducidas por cianuro y 2 reprimidas. 3) El alineamiento en el análisis BN-PAGE demuestra la presencia del complejo proteico fosfoenolpiruvato sintasa/DnaK, que se induce por cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Referencias

[1] Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment; *Journal of Hazardous Materials* 2009; 163; 1-11.

[2] Mirizadeh, S., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014; 12; 1.

[3] Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M. D., García-Gil, L. J., & Blasco, R. Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005; 71, 940-947.

[4] Luque-Almagro, V. M., Merchan, F., Blasco, R., Igeño, M. I., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivian, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involves a malate: quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain. *Microbiology*. 2011; 157; 739-746.

[5] Estepa, J., Luque- Almagro, V. M., Manso, I., Escribano, M. P., Martínez- Luque, M., Castillo, F., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. The *nit1C* gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environmental Microbiology Reports*. 2012; 4; 326-334.

[6] Shakir, F. K., Audilet, D., Drake 3rd, A. J., & Shakir, K. M. A rapid protein determination by modification of the Lowry procedure. *Analytical Biochemistry*. 1994; 216; 232.

[7] Morrison G. R. Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler reagent. *Analytical Biochemistry.*1971; 43; 527-532.

[8] Solorzano, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*. 1969; 14; 799-801.

[9] Asmus, E., & Garschagen, H. The use of barbituric acid for the photometric determination of cyanide and thiocyanate. *Z Analytical Chemistry*. 1953; 138; 414-422.

Capítulo 24. Análisis genómicos y transcriptómicos de la infección por vertilicio en el olivo (Olea europaea)

Díez Aparicio, Ángel; Rodríguez Franco, Antonio

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Bioquímica.

Edificio Severo Ochoa. Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba. E-mail: b22diapa@uco.es

Resumen

La verticilosis es una enfermedad causada por el hongo *Verticillium dahliae* que afecta a una amplia variedad de cultivos, entre los que se encuentra el olivo (*Olea europaea*).

Hay plantas como el tomate que contienen genes capaces de conferir resistencia a *V. dahliae*. Así, los genes *Ve1* y *Ve2* de tomate expresan proteínas capaces de conferir resistencia a la verticilosis tanto en la planta original como en las transgénicas que han recibido dichos genes.

Al comienzo de la beca, no existían ni un genoma de referencia ni transcriptoma del olivo que nos aportase la secuencia de los dos genes *Ve* ortólogos del olivo. Mediante técnicas bioinformáticas queremos generar un transcriptoma ensamblando secuencias de ADNc obtenidas a partir de hojas y raíces control infectadas con este hongo. Estas secuencias fueron obtenidas desde la base de datos pública SRA del NCBI. Para la generación del transcriptoma emplearemos Trinity usando para ello un servidor Galaxy implementado en la Universidad de Indiana (EE.UU). En el transcriptoma hemos identificado cuatro transcritos del olivo que codifican proteínas con una homología y una longitud similares al gen *Ve1* del tomate. Estas secuencias pueden valorarse y manipularse para conferir resistencia a verticilosis en los olivos.

Fundamento, Metodología, Resultados y Conclusiones

La verticilosis es una enfermedad fúngica causada por *V. dahliae* que provoca pérdidas en el rendimiento y en la calidad en muchos cultivos [1]. En la actualidad, supone un grave problema para el olivo llegando a provocar que el árbol se seque por completo [2].

Se sabe que hay ciertos tipos de plantas que presentan mecanismos de resistencia a *V. dahliae,* cuando éste se encuentra en su fase pre-vascular o vascular. Aunque los procesos fisiológicos que determinan esta resistencia son conocidos, los mecanismos moleculares que subyacen a estos procesos no han sido identificados. La resistencia ha sido detectada en un gran número de plantas. Sin embargo, solo ha sido clonado el gen *Ve1* capaz de conferir resistencia en el tomate. En el locus *Ve* de tomate hay dos genes, *Ve1* y *Ve2*. Aunque se considera que ambos aportan resistencia cuando se expresan, en el caso del tomate solo el gen *Ve1* parece ser capaz de conferirla [3].

En el momento en el que se inició el trabajo correspondiente a esta beca, no había un genoma o un transcriptoma del olivo que estuviese publicado y disponible. Se desconocía por tanto si este árbol contenía o no genes ortólogos al *Ve1* de tomate que pudieran manipularse para tratar de conferir resistencia a verticilosis. Para comprobar la presencia de estos genes en el olivo decidimos generar un transcriptoma a partir de secuencias de ARNm aislado a partir de hojas y raíces de olivo infectados con verticilio que habían sido publicadas en bases de datos públicas. De ser éste el caso, dichas copias ortólogas al *Ve1* de tomate podrían manipularse para tratar de conferir resistencia a *V. dahliae*. Además, dicho transcriptoma puede llegar a anotarse y usarse como referencia para los futuros análisis mediante RNA-Seq.

Para llevar a cabo el trabajo empleamos secuencias que hemos obtenido de la base de datos SRA del NCBI. Corresponden a secuencias obtenidas mediante secuenciación Illumina a partir de hojas y raíces de olivo que no han sido tratadas (y que usamos como control) así como otras tras 2, 7 y 15 días de haberse infectado con *V. dahliae*. El procedimiento, así como los protocolos seguidos para realizar las extracciones están descritos dentro del mismo archivo SRA, a los cuales se puede acceder a través del siguiente enlace: http://1.usa.gov/1tbEUC3.

Para descargar las secuencias emplearemos comandos de Linux haciendo uso de los programas incluidos en el SRA toolkit (http://1.usa.gov/212FnAX). Podemos emplear el comando *fastq-dump* para extraer las secuencias en formato fastq únicamente indicando la referencia de las secuencias que queremos usar.

Un paso fundamental para la generación de un transcriptoma es determinar la calidad de las secuencias obtenidas mediante la secuenciación. Después de analizarlo con el programa FastQC vimos que todos las secuencias tienen bastante calidad por lo que no es necesario realizar ningún tipo de filtrado ni tratamiento antes de emplearlas.

Una vez analizada la calidad, procedemos a ensamblar las secuencias. Para ello empleamos el programa Trinity [4] implementado en la plataforma web Galaxy de la Universidad de Indiana (http://bit.ly/1XxFw1v). Esto fue necesario porque disponíamos de más de 128Gb de datos de secuencia, y la aplicación informática requería del uso de un superordenador con al menos 256Gb de memoria RAM.

El número de archivos con transcritos en formato fasta que Trinity generó fue de 997872. Será en el transcriptoma generado donde buscamos las secuencias que presentan homología con el gen *Ve1* del tomate. El siguiente paso es encontrar secuencias que tengan una alta

similitud/homología con el gen *Ve1* de tomate que podría utilizarse para tratar de conferir resistencia a la verticilosis. Para hacerlo, realizamos un BLAST usando el gen *Ve1* de tomate como patrón.

El primer paso es crear un archivo índice del transcriptoma que hemos denominado Transcriptoma_Galaxy.fasta empleando un programa disponible en internet llamado makeblastdb. Para buscar genes homólogos al gen *Ve1* de tomate en el olivo empleamos el programa BlastN de NCBI implementado localmente empleando para ello comandos de Linux. Al buscar la homología se crea un archivo, Megablast.txt, que contiene las secuencias de mayor similitud con nuestro *query*. En nuestro caso encontramos cuatro secuencias que presentan una homología bastante alta con el *Ve1* del tomate. Estas cuatro secuencias son extraídas con un programa llamado faSomeRecords y son analizadas para determinar si se tratan de proteínas ortólogas a la del tomate y poder concluir de esta forma que el olivo presenta o no resistencia a verticilosis.

Una vez extraídas vemos si existe redundancia, es decir si son las mismas secuencias o se trata de secuencias diferentes entre sí. Para ello empleamos un programa capaz de alinear varias secuencias llamado Clustal Omega. Con este programa se genera un archivo que nos alinea de forma paralela las distintas secuencias con la finalidad de ver cuáles son las partes que presentan mayor homología. Los resultados muestran que tres de las secuencias son muy parecidas, prácticamente las mismas, mientras que la otra secuencia es diferente. Esto puede deberse a múltiples alineamientos del transcriptoma, a una mala calidad del ensamblado que hace que no encuentre homología en el último tramo de la proteína, o simplemente a que la parte amino terminal de las proteínas sean diferentes.

Empleamos BlastX para traducir nuestras secuencias en cualquiera de las 6 fases de lectura posibles, y posteriormente realiza un BlastP con todas y cada una de las proteínas obtenidas, sean aberrantes o no. BlastX proporciona aquella/s proteína/s ya caracterizada/s previamente que tiene/n homología con la proteína codificada por la secuencia de ADN usada como *query*. Los resultados indicaron que las proteínas obtenidas a partir del transcriptoma compartían un 74-75% de identidad con la proteína del tomate. Esto es un alto porcentaje teniendo en cuenta que estamos comparando una planta herbácea con un árbol leñoso.

Todas las proteínas del olivo obtenidas a partir de cada una de las secuencias contienen dominios similares. InterPro verifica que la proteína que se obtiene a partir del ADNc del olivo contiene los mismos dominios que el gen *Ve1* de olivo. Así, observamos que la proteína contiene dominios ricos en leucina típicos de una proteína LRR en posiciones similares a los encontrados en el gen *Ve1* del tomate. Estos dominios están presentes en receptores de tirosina quinasa, adhesión celular, glicoproteínas de unión a la matriz extracelular, y participan en una variedad de procesos biológicos, incluyendo la transducción de señales, resistencia a enfermedades, la apoptosis y la respuesta inmune, entre otros.

La base de datos InterPro también posee un enlace que nos lleva a posibles funciones moleculares, procesos biológicos o el componente celular donde se encuentra la proteína. Para ello establece referencias cruzadas con otra base de datos como son las GO. En este caso, solo ha tenido capacidad de predecir la función molecular, indicando que se trata de una proteína de adhesión. Interviene en procesos de unión covalente y no covalente con otras proteínas o complejos proteicos (http://bit.ly/28MjZFL). Con SignalP buscamos si la proteína del olivo presenta un péptido señal como el que presenta el tomate y vemos que efectivamente también lo posee, aunque el tamaño es diferente.

Con todos estos resultados podemos decir que el olivo presenta gen de resistencia a verticilio. Sería interesante diseñar cebadores para poder clonar el gen y determinar si obtenemos la banda correspondiente al gen del que estamos hablando. Introduciendo la secuencia del gen obtenida en el transcriptoma y poniendo una serie de parámetros obtenemos 10 parejas de cebadores que pueden ser empleados para clonar el gen.

Conclusiones

1. Hemos generado un transcriptoma de olivo a partir de secuencias de ADNc obtenidas de muestras de hojas y raíces tanto control como infectadas con el hongo *Verticillium*.

2. En el transcriptoma de olivo se ha encontrado al menos 4 ensamblados que son fuertes candidatos a ser verdaderos transcritos ortólogos al gen *Ve1* de tomate. Estos transcritos presentan una longitud y homología muy similares, y contienen tanto los dominios como el péptido señal típicos de este gen.

3. Estos datos sugieren que el transcriptoma generado es de elevada calidad, pudiendo usarse por tanto, como transcriptoma de referencia para realizar estudios de expresión en futuros experimentos.

4. Hemos diseñado cebadores específicos capaces de clonar la secuencia completa que contiene el CDS de dicho gen.

5. Este trabajo sienta unas bases importantes con las que se puede tratar de conseguir generar olivos que pueden ser resistentes al verticilio.

Bibliografía

[1] L. M. Kawchuk, J. Hachey, D. R. Lynch, F. Kulcsar, G. van Rooijen, D. R. Waterer, A. Robertson, E. Kokko, R. Byers, R.J. Howard, R. Fischer, D. Prufer, Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface like receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, vol. 98, no.11, p. 6511-6515.

[2] M. Saavedra-Saavedra, C. Alcantara-Braña, Qué puede hacer el agricultor frente a la Verticilosis en olivar, 2010, p. 1-38

[3] E. Fradin, A. Abd-El-Haliem, L. Masini, G. C.M. van den Berg, M. H.A.J. Joosten, B. P.H.J. Thomma, Interfamily transfer of tomato Ve1 mediates Verticillium resistance in Arabidopsis, Plant physiology, 2011, vol. 156, no. 4, p. 2255-2265.

[4] J. A. Martin, Z. Wang, Next generation transcriptome assembly, Nature Review Genetics, 2011, vol. 12, no. 10, p. 671-682.

Capítulo 25. Detección de la mosca del olivo mediante determinación de feromona en el fruto

Isabel Ferrera Fenoy

Tutores: Mª Carmen Alcudia León/Mª Soledad Cárdenas Aranzana

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.

Edificio Marie Curie. Anexo (C-3). Campus Universitario de Rabanales. E-mail: a22fefei@uco.es

Resumen

La *Bactrocera oleae,* conocida vulgarmente como la mosca del olivo, es considerada la plaga más problemática que afecta al cultivo del olivo. La larva se alimenta del fruto, dañando la productividad y la calidad de los productos finales, produciendo graves pérdidas económicas en este sector agrario. El control de esta plaga, normalmente requiere la aplicación de pesticidas en concentraciones altas que al ser poco selectivos, ocasionan preocupantes efectos secundarios medio ambientales.

El objetivo de la presente investigación, es el desarrollo de métodos analíticos para la detección de la plaga y de alternativas instrumentales para su control, que podrían reducir esos problemas secundarios.

Para la identificación de la plaga de la mosca del olivo, se usará el componente mayoritario de su feromona sexual como marcador. Este compuesto es altamente selectivo, sólo es segregado por individuos de esta especie. En este estudio, se aprovechará su volatilidad empleando la combinación de la técnica del espacio de cabeza junto a la cromatografía de gases con la detección por la espectrometría de masas.

El método propuesto se caracteriza por su simplicidad, automatización y robustez, y sigue los principios de la química analítica verde. Además, permite el análisis directo de la muestra sin necesidad de tratamiento previo más allá de una simple trituración y homogenización del fruto.

Fundamento

Dado el importante impacto tanto económico como ambiental que produce *Bactrocera oleae*, debido a las numerosas cosechas perdidas y al excesivo uso de pesticidas requerido para su control, se propone identificar su presencia en cultivos usando el componente principal de su feromona sexual como marcador: 1,7-dioxaspiro-[5,5]-undecano.

Teniendo en cuenta la volatilidad de este compuesto, el trabajo de iniciación a la investigación se orientó hacia el desarrollo de una metodología basada en la combinación de espacio de cabeza (HS) y cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS) para llevar a cabo la determinación del analito de interés. Se estudiaron y optimizaron las diferentes variables implicadas en el proceso. La metodología desarrollada se caracterizó en términos de linealidad, sensibilidad y precisión y se analizaron muestras reales para demostrar su aplicabilidad. Finalmente, se abordó el estudio de diferentes fracciones del fruto con objeto de conocer donde se produce mayor la acumulación de feromona.

Metodología

Para la determinación de la presencia del componente mayoritario de la feromona sexual de la *Bactrocera oleae* en las muestras de aceitunas se pesaron alícuotas de 8.25 g de aceituna triturada en viales de 10 mL de espacio de cabeza, que se sellaron herméticamente con un septum de silicona y se colocaron en el automuestreador. El brazo robótico tomó cada vial de la bandeja y los trasladó al horno, donde se mantuvieron a 80°C durante 65 min bajo agitación mecánica a 250 rpm para favorecer el paso cuantitativo del analito desde la muestra al espacio de cabeza del vial. Finalmente, se introdujeron 2.25 mL del espacio de cabeza mediante una jeringa mantenida a 120°C para evitar condensaciones en el GC/MS para la separación, identificación y cuantificación del 1,7-dioxaspiro-[5,5]-undecano.

Resultados

- Optimización del proceso analítico. Estudio de las condiciones del espacio de cabeza

El desarrollo de un método instrumental simple y sensible para la determinación del componente principal de la feromona sexual de la *Bactrocera oleae* en nuestras aceitunas mediante la triple hibridación HS-GC/MS conlleva el estudio en profundidad todas las variables implicadas en el proceso de extracción. Se seleccionó una optimización univariante con tres réplicas para cada punto empleando muestras de aceitunas sanas fortificadas a una concentración de 200 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ que se dejaron reposar 24 horas antes de su análisis, para permitir la interacción del analito con la matriz de la muestra. Las variables seleccionadas, el intervalo estudiado y los valores óptimos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Variables optimizadas para la determinación de 1,7-dioxaspiro-[5,5]-undecano mediante HS-GC/MS.

Variable	Valor inicial	Intervalo estudiado	Valor seleccionado
Temperatura de extracción (°C)	-	40-80	80
Disolventes orgánicos (0-10% v/w)	0%	n-hexano, acetonitrilo, acetato de etilo	0%
Volumen de inyección (mL)	1	0.5-2.5	2.25
Cantidad de muestra (g)	2.5	0.5-9	8.25
Velocidad de agitación (r.p.m)	250	250-750	250
Tiempo de extracción (min)	2	2-120	65

- Características analíticas

El procedimiento propuesto se caracterizó analíticamente para la determinación de 1,7-dioxaspiro-[5,5]-undecano en muestras de aceituna. La recta de calibrado se construyó a partir de la extracción por triplicado de siete muestras de aceitunas fortificadas a diferentes niveles de concentración en el intervalo del límite de cuantificación – 2000 $\mu g \cdot Kg^{-1}$ obteniendo una buena linealidad (R^2= 0,9997). Los límites de detección (9.34 $\mu g \cdot Kg^{-1}$) y cuantificación (31.14 $\mu g \cdot Kg^{-1}$) se calcularon para una relación señal-ruido igual a 3 o 10, respectivamente. La precisión fue del 6 %, expresada con desviación estándar relativa y se calculó mediante el análisis independiente de siete muestras de aceituna fortificadas con el analito a una concentración de 35 $\mu g \cdot Kg^{-1}$. Se analizaron siete muestras de aceitunas de diferentes variedades (Picual, Cornicabra, Arberquina y Hojiblanca) y cultivadas en diferentes localizaciones de la provincia de Córdoba (Posadas, El Carpio y Montoro). En todas ellas se detectó la presencia de feromona.

Para evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se llevó a cabo un estudio de recuperación del analito en las tres muestras que presentaban un menor nivel de feromona a tres niveles de concentración: 35, 70 y 100 $\mu g \cdot Kg^{-1}$. Todas las recuperaciones estuvieron en el intervalo del 92% al 107%, lo que indica la idoneidad del método para el fin propuesto.

- Análisis de muestras

Una vez validado el método, se procedió al análisis por triplicado de las siete muestras de aceitunas de diferente variedad y localización. Todas las muestras analizadas presentaban el analito (Tabla 2) aunque en todas ellas no se puede llevar a cabo la cuantificación, pues su concentración estaba por debajo del LQ (Cornicabra, Picual I y Picual III). Los valores obtenidos están en concordancia con los datos publicados por la Junta de Andalucía a través de las capturas de moscas del olivo en trampas por día [1]. Como puede observarse, hay una correlación entre la incidencia de la plaga y las concentraciones de feromonas en las muestras.

Tabla 2. Análisis de diferentes variedades de aceituna y localizaciones muestreadas.

Posadas		El Carpio			Montoro	
Picual	Cornicabra	Arbequina	Hojiblanca I	Picual II	Picual III	Hojiblanca II
252 ± 15	Detectado	59 ± 4	128 ± 8	Detectado	Detectado	72 ± 4

El análisis por separado de distintas fracciones del fruto (piel + pulpa y hueso), para conocer dónde es mayor la acumulación de la feromona (Tabla 3) reveló que la feromona se encuentra en la piel + pulpa (principalmente) y no en el hueso. Por esto, la concentración de la fracción entera es menor que en la pulpa, por la dilución que produce el hueso. Como se ha comprobado en la bibliografía la larva no es capaz de dañar el hueso [2], por lo que no debe aparecer la feromona en él.

Tabla 3. Análisis de diferentes fracciones (entero, piel + pulpa y hueso) de aceitunas dañadas por la Bactrocera Oleae.

Picual			Arbequina		
Entero	Piel + Pulpa	Hueso	Entero	Piel + Pulpa	Hueso
252 ± 15	325 ± 19	-	59 ± 4	74 ± 4	-
Hojiblanca I			Hojiblanca II		
Entero	Piel + Pulpa	Hueso	Entero	Piel + Pulpa	Hueso
103 ± 6	128 ± 8	-	72 ± 4	89 ± 5	-

Conclusiones

Este estudio de iniciación a la investigación presenta una nueva metodología analítica que hace uso de la hibridación instrumental HC-GC/MS para la determinación del componente principal de la feromona sexual de la *Bactrocera oleae*, en muestras de aceitunas.

La metodología propuesta es simple, rápida y completamente automatizada y por tanto podría emplearse en los laboratorios de rutina; permitiendo la determinación del componente feromonal a bajas concentraciones (9.34 $\mu g \cdot Kg^{-1}$) y con buena precisión (6%). Las recuperaciones relativas están en el rango entre 93 y 98% para los diferentes cultivos de olivo, lo que confirma la aplicabilidad del método propuesto. La principal ventaja del método propuesto, es que permite el análisis directo de las muestras ya que solo se requiere la trituración y la homogenización de las aceitunas. Para una mayor sensibilidad de la medida, se recomienda analizar únicamente la piel-pulpa ya que en ella la concentración de la feromona es mayor.

Bibliografía

[1] Visor RAIF, Red de Alerta e Información Fitosanitaria; Consejería de agricultura, pesca y desarrollo rural. Junta de Andalucía, (2016). Consultado el 15/06/16.

[2] J.L. Molina Rosa, B. Jiménez Herrera, F. Ruiz Coleto, F. García Zamorano, J. Cano Rodriguez, J. Perez García; Técnicas de cultivo: Plagas y enfermedades del olivo; Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía; Servicio de Publicaciones y Divulgación; Sevilla, (2010).

Agradecimientos

- Universidad de Córdoba. I Convocatoria de Becas Semillero de Investigación (2015).

- Departamento de Química Analítica, concretamente al grupo de investigación FQM 215 de automatización, simplificación, miniaturización y calidad de procesos (bio) químicos de medida de la Junta de Andalucía dirigido por el profesor Dr. Miguel Valcárcel Cases.

- Y especialmente, a mis dos tutoras del trabajo de investigación desarrollado: Mª Soledad Cárdenas Aranzana y Mª Carmen Alcudia León de la Universidad de Córdoba.

Capítulo 26. Papel de las nitrato reductasas en el metabolismo nitrogenado de *Fusarium oxysporum*

Lucía Gómez Gil

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Genética.

Carretera nacional IV, Km 396. 14071 Córdoba. E-mail:b12gogil@uco.es

Resumen

En ausencia de fuentes de nitrógeno primarias, los hongos metabolizan el nitrato (NO_3^-), la forma más abundante de nitrógeno inorgánico en suelos. Su asimilación depende de tres genes responsables, respectivamente, de un transportador de nitrato de alta afinidad, de una nitrato y una nitrito reductasas. En la mayoría de hongos filamentosos, estos genes están regulados de forma coordinada y se localizan en un clúster denominado fHANT-AC. Sin embargo, en los Sordariomycetes, como *F. oxysporum*, estos genes se encuentran en cromosomas distintos, requiriendo probablemente una regulación más compleja. En este trabajo se ha estudiado la importancia de dos presuntas nitrato reductasas, genes *nit1* y *nit2*, en la asimilación del nitrógeno y en la virulencia de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Los resultados obtenidos muestran que Nit1 es la responsable principal de la asimilación de nitrato y que ambas contribuyen al desarrollo de la marchitez vascular, aunque ninguna por sí misma es esencial para la virulencia.

Fundamento

El nitrógeno es esencial para el crecimiento y desarrollo en microorganismos y además puede desempeñar un papel relevante en patogénesis. En *F. oxysporum*, *Fnr1*, un regulador global del nitrógeno, es determinante para el crecimiento del hongo *in planta*, siendo la tasa de infección de los mutantes en este regulador en plántulas de tomate significativamente inferior que la estirpe silvestre [1].

Fusarium oxysporum, es capaz de patogenizar más de 120 especies vegetales y de infectar a animales inmuno-deprimidos [2].

En este trabajo se ha analizado el papel de dos nitrato reductasas (Nit1 y Nit2) en el metabolismo del nitrógeno y en la infección de *F. oxysporum* f.sp. l*ycopersici*. Para ello, se han generado dobles mutantes (*Δnit1Δnit2*) y se han comparado sus fenotipos a nivel bioquímico, fisiológico y patotípico con los mutantes simples *Δnit1* y *Δnit2* y el silvestre.

Metodología

Utilizando la estrategia de "Split-Marker" se delecionó el gen de interés, denominado *nit2* [3]. Se transformaron protoplastos de un mutante Δ*nit1*, resistente a higromicina (Hyg^R). De esta forma, se seleccionaron dobles mutantes (Δ*nit1*Δ*nit2*) para determinar el papel del conjunto nitrato reductasa. Los transformantes se analizaron mediante PCR sobre ADNg con cebadores de la fase codificante (ORF) del gen *nit2*; y posteriormente mediante análisis Southern.

Para la caracterización fenotípica de los transformantes se realizaron ensayos de crecimiento en medios sólido y líquido, en distintas fuentes de nitrógeno.

La expresión de ambos genes *nit* se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Y finalmente, se determinó su papel en la virulencia mediante ensayos de infección en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum).*

Resultados

Análisis de hibridación Southern

Los transformantes obtenidos se analizaron mediante hibridación Southern del ADNg tratado con *Sal* I con dos sondas: una de la región terminadora del gen *nit2*; y otra de una región interna del casete Phl^R (Fig. 1A).

El patrón de bandas muestra que los cuatro transformantes son recombinantes homólogos que han reemplazado la banda de 4,2 kb de la estirpe silvestre. No obstante, solo el transformante #22 presenta la banda del tamaño esperado (14 kb) que también hibrida con la sonda fleomicina indicativo de una integración única en el locus específico. El resto de los transformantes muestra inserciones múltiples en el genoma (Figura 1B).

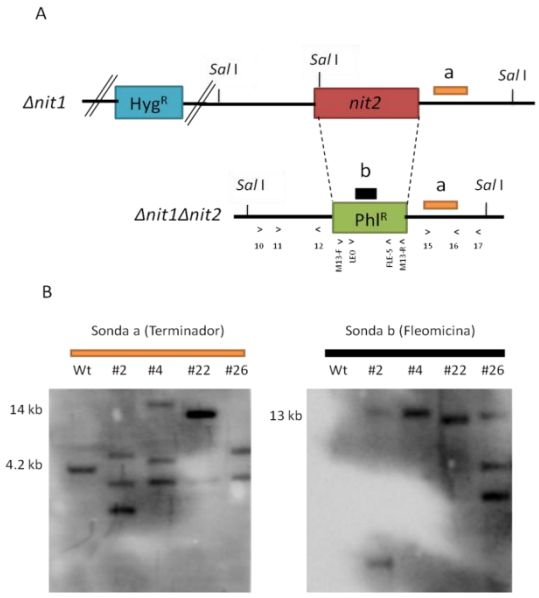


Figura 1. Interrupción dirigida del gen nit2. A Estrategia para la sustitución de la región codificante por el casete (PhlR) con fenotipo seleccionable. Se indican los cebadores empleados en PCR, las sondas para la hibridación Southern (a y b) y los sitios Sal I. B Comprobación de la interrupción de nit2 en los transformantes, usando la estirpe silvestre (wt) como control, mediante análisis Southern del ADNg tratado con Sal I usando las sondas indicadas: "a" o "b"

Caracterización fenotípica de los mutantes

En presencia de una fuente de nitrógeno preferencial, como el amonio, tanto el silvestre como los mutantes crecen de manera similar. En presencia de hipoxantina, tanto los mutantes dobles como los simples crecen mejor que el silvestre. Ello podría deberse a que en ausencia de nitrato reductasas, la purina deshidrogenasa tendría mayor disponibilidad por el cofactor de molibdeno para convertir la hipoxantina en xantina [4].

Los dobles mutantes también crecen mejor que la estirpe silvestre en nitrito, posiblemente debido a que las nitrito reductasas no competirían por el intermediario UROIII de la vía sintética de los grupos hemo y sirohemo. Sin embargo, en presencia de nitrato, los mutantes Δ*nit1*Δ*nit2* y Δ*nit1* tienen crecimiento reducido debido a la casi incapacidad de asimilar el nitrato por ausencia de una o ambas nitrato reductasas.

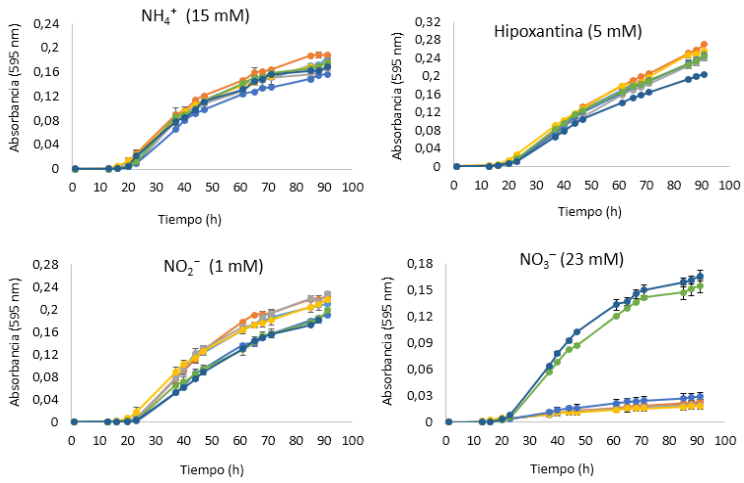


Figura 2.Crecimiento de la estirpe silvestre (●), los transformantes Δnit1 #10 (●), Δnit2 #12 (●), Δnit1Δnit2 #2 (●), Δnit1Δnit2 #4 (●), Δnit1Δnit2#22 (●) y Δnit1Δnit2 #26 (●) en medio mínimo líquido con distintas fuentes de nitrógeno: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amonio (NH_4^+) e hipoxantina. Se representa el error estándar calculado a partir de dos réplicas biológicas, incluyendo cada una tres réplicas técnicas.

<u>*Perfil de expresión in vitro de los genes nitrato reductasa*</u>

Como era de esperar tanto los mutantes dobles Δ*nit1*Δ*nit2* como simples Δ*nit1* y Δ*nit2*, no presentan expresión del gen *nit* delecionado (Fig. 3). No obstante, en el caso de los mutantes simples, se observa la sobreexpresión del otro parálogo *nit* a niveles de 4 veces y 0,36 veces respectivamente. En el caso del mutante *NITFG*, se observa que *nit1* y *nit2* se sobreexpresan 5 y 6 veces, respectivamente, en comparación con la estirpe silvestre.

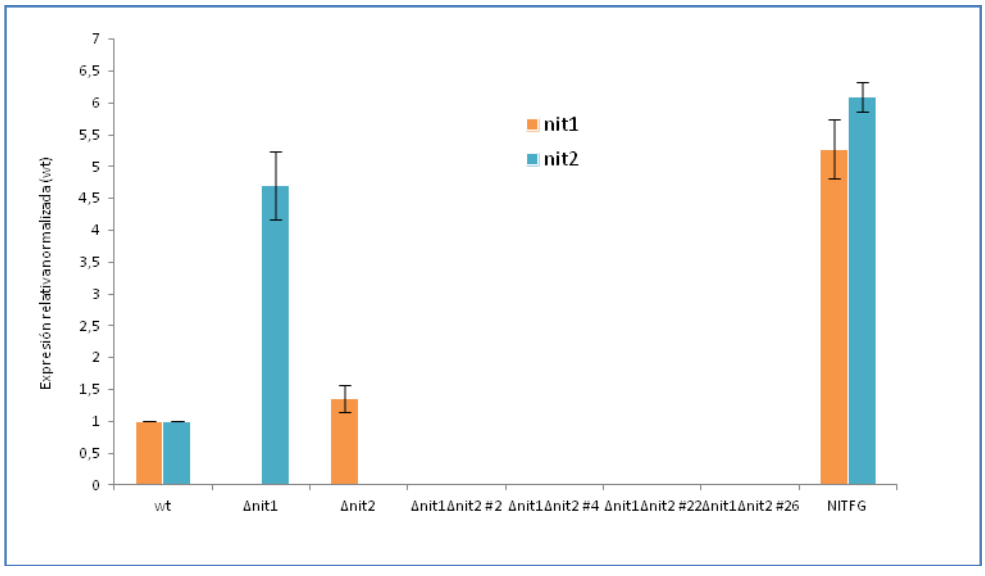


Figura 3. Expresión de genes nitrato reductasas en la estirpe silvestre, en los mutantes Δnit1, Δnit2, Δnit1Δnit2 y en el mutante espontáneo NITFG, en NO_3^- como única fuente de nitrógeno, tras 4 horas de inducción. Se muestra la expresión con respecto a la estirpe silvestre (wt) y normalizada para actina. Las barras de error representan el error estándar calculado a partir de dos réplicas biológicas, incluyendo en cada una dos réplicas técnicas.

Conclusiones

1. Nit1 es la principal nitrato reductasa producida en condiciones de inducción.
2. Los mutantes afectados en alguna de las nitrato reductasa presentan un crecimiento residual en nitrato comparado con la estirpe silvestre.
3. Los mutantes sencillos Δ*nit1* y Δ*nit2* sobreexpresan el otro gen (*nit)* parálogo posiblemente como mecanismo compensatorio para optimizar la asimilación de nitrato.
4. Ninguno de los genes estructurales nitrato reductasa resultan esenciales para la virulencia del hongo sobre plantas de tomate.

Bibliografía

[1] Divon HH, Ziv C, Davydov O, Yarden O, Fluhr R (2006) Mol Plant Pathol 7: 485-97.

[2] Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, Di Pietro A (2004) Infect Immun72: 1760-1766.

[3] Catlett NL, Lee BN, Poder OC, Turgeon G (2003) Fungal Genetics Newsletter 50: 9-11.

[4] Correll JC, Klittich CJR, Leslie JF (1987) The American Phytopathological Society, 77: 1640-1646.

Capítulo 27. Síntesis y caracterización de grafenos tridimensionales. Aplicación como electrodos en baterías Litio-Azufre

Celia Hernández Rentero

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química.

Campus de Rabanales. E-mail:q12herec@uco.es

Resumen

El trabajo se ha centrado en el estudio de diferentes grafenos tridimensionales y su capacidad de alojar azufre en sus cavidades para examinar sus propiedades en baterías Li/S. Para ello, se sintetizaron hidrogeles partiendo de óxido grafítico mediante tratamiento hidrotermal. Para favorecer el crecimiento en 3D se usaron como aditivos sacarosa (para mitigar la tendencia de las láminas a re-empaquetarse) y el agente surfactante dodecil sulfato sódico (SDS) (para favorecer la unión entre el óxido grafítico y la sacarosa). Tras el tratamiento hidrotermal, los grafenos se calcinaron a 900ºC en atmósfera de N_2. Los grafenos se caracterizaron mediante diferentes técnicas: XRD, Raman, SEM, XPS, ATG y medidas de adsorción/desorción de N_2.

Para su estudio como componentes catódicos de la batería Li/S, la impregnación de los grafenos con S se realizó "in situ" utilizando una disolución de tiosulfato sódico en medio ácido como fuente del elemento. Las propiedades electroquímicas de las celdas se estudiaron mediante voltametría cíclica y cronopotenciometría. Sólo los grafenos calcinados dieron buenas propiedades electroquímicas reflejadas en la liberación de altas capacidades específicas, buenas propiedades de ciclaje y una respuesta satisfactoria a altas densidades de corriente.

Fundamento

El grafeno es una lámina de átomos de C formando un retículo bidimensional de hexágonos que se extiende en dos dimensiones. Estas láminas tienen limitaciones para aplicaciones en campos específicos. La metodología más común para integrar las láminas individuales del grafeno 2D para formar estructuras porosas 3D es mediante técnicas de formación de geles, generalmente en agua (hidrogeles) [1]. Con ello se puede lograr la conexión y un ordenamiento a largo alcance entre las láminas de grafeno. Este método se basa en el tratamiento hidrotermal de suspensiones de óxido grafítico (GO). Se considera que antes de la reducción, las láminas hidrofílicas del GO se dispersan bien en el agua; al aumentar el tiempo de reducción los grupos funcionales de oxígeno se eliminan gradualmente y las estructuras conjugadas se restablecen. El aumento del carácter hidrofóbico y de las interacciones π- π entre las láminas de GO reducido conduce a un auto-ensamblaje al azar de las láminas flexibles en 3D, que eventualmente forman un hidrogel con una distribución de tamaño de poros desde sub-micrométrico a micrométrico.

Una batería es un dispositivo electroquímico de almacenamiento de energía. En ella se produce una reacción electroquímica de oxidación–reducción que transforma la energía química en energía eléctrica. Estas reacciones implican la transferencia de electrones de un material a través de un circuito eléctrico. . El azufre es un elemento ligero capaz de reaccionar electroquímicamente con el Li de manera reversible, reacción en la que se transfieren dos electrones:

$$2\,Li + S \rightleftharpoons Li_2S \qquad E_0 = 2{,}15\ V \quad (1)$$

En términos de capacidad y energía específica teórica, esta reacción suministra 1675 mAh g^{-1} y 2600 Wh kg^{-1}, valores muy superiores a los calculados para las baterías Li-ión. Sin embargo, para el desarrollo práctico de la batería Li-azufre todavía quedan inconvenientes por superar, entre los que cabe destacar [2]: (i) baja conductividad eléctrica del azufre y del sulfuro formado; (ii) cambios de volumen y estructurales significativos durante la reacción; (iii) (iv) pérdida del material activo en el cátodo por efecto "shuttle"; (iv) caída de la capacidad al depositarse los polisulfuros en la superficie del ánodo y formación de dendritas en el ánodo al utilizar litio metálico. En este trabajo se han intentado mitigar los dos primeros inconvenientes.

Metodología

El objetivo de este trabajo se centra en la síntesis de grafenos tridimensionales con una elevada superficie específica y una porosidad adecuada para favorecer una fuerte interacción entre el azufre y la matriz de carbón. Con estas premisas, el composite grafeno 3D/S debe dar una buena respuesta electroquímica cuando actúa como cátodo en baterías Li/S.

Los pasos seguidos en este trabajo fueron: síntesis de óxido grafítico; síntesis de grafenos 3D (calcinados y sin calcinar); caracterización de sus propiedades estructurales y texturales; preparación y caracterización de los composites grafenos 3D/S y finalmente estudio de sus propiedades como electrodos en baterías Li/S.

Se sintetizaron 4 carbones diferentes: dos utilizando como aditivo sacarosa (uno no calcinado, **3DG HT_S**, y otro calcinado a 900 ºC, **3DG $HT_{S\text{-}900}$**) y otros dos empleando como aditivos sacarosa y dodecil sulfato sódico (sin calcinar, **3DG $HT_{S\text{-}SDS}$**, y calcinado **3DG $HT_{S\text{-}SDS\text{-}900}$)**. El nombre de los composites será el formado por el símbolo utilizado para el carbón añadiéndole "/S".

La caracterización estructural y morfológica se realizó mediante difracción de rayos X (DRX), espectroscopía Raman, microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), análisis termogravimétrico (ATG) y medidas de adsorción/desorción de N_2. Las propiedades electroquímicas de las celdas se estudiaron mediante voltametría cíclica y cronopotenciometría.

Resultados y discusión

Los datos de DRX confirmaron la variación del espaciado interlaminar sufrida por el óxido grafítico al transformarse en grafeno, junto con aumento significativo del grado de desorden de la estructura. Los espectros de Raman confirmaron esta última observación. El S de naturaleza cristalina se distribuyó de manera homogénea en la superficie de las partículas de los composites.

El estudio de la morfología mediante MEB aporta imágenes que muestran como el GO está formado por partículas lisas con apilamiento de láminas. Las imágenes de los materiales resultantes de los tratamientos hidrotermales y térmicos ponen de manifiesto, el proceso de exfoliación sufrido por las partículas de GO y el autoemsablado de las láminas formando un retículo tridimensional. Ni la naturaleza de los aditivos ni la deposición del S produjo cambios significativos en la morfología de las partículas.

La técnica de ATG suministró información del contenido de grupos funcionales oxigenados de los carbones así como de la cantidad de S depositada. El tratamiento hidrotermal del GO elimina parte de los grupos funcionales aproximadamente un 50%. Los espectros XPS confirmaron esta pérdida, además de suministrar información de la naturaleza del grupo funcional. La mayor cantidad de S se observó en los grafenos calcinados, un 39% en la muestra 3DG $HT_{S\text{-}900}$/S y un 52% en la 3DG $HT_{S\text{-}SDS\text{-}900}$/S.

Los valores de superficie específica y volumen de poros se determinaron de las isotermas de adsorción/desorción de N_2. Los grafenos calcinados poseen los valores mayores de ambos parámetros, consecuencia de la pérdida de grupos funcionales y consiguiente formación de poros en el retículo. La drástica disminución de la superficie y volumen de poro de los composites confirma la localización de las partículas de S en el sistema de poros del grafeno.

La caracterización electroquímica se inició con las medidas de voltametría cíclica para analizar las etapas de la reacción entre el Li y el S [3]. Las curvas de los composites con grafenos sin calcinar no dieron los picos esperados por lo que se desestimó continuar su estudio.

Dos medidas adicionales se realizaron con los composites de grafenos calcinados, una de tipo galvanostático utilizando una intensidad de 100 mA/g. Las capacidades en función del número de ciclos obtenidas para el composite 3DG $HT_{S\text{-}SDS\text{-}900}$/S son mayores que las del composite 3DG $HT_{S\text{-}900}$/S, Fig. 1a, en buen acuerdo con los mayores valores de superficie y volumen de poros. La eficiencia coulómbica de ambos materiales fue cercana al 100%. La segunda medida consistió en ciclar los electrodos a diferentes densidades de corriente (rate capability) ascendentes y observando su recuperación al establecer de nuevo la velocidad inicial, Fig 1b. El electrodo respondió bien a estos cambios de intensidades de corriente. Señalar que ambas medidas se vieron afectadas por el corte de luz del mes de Agosto. Actualmente estas medidas se están repitiendo y completando para obtener un comportamiento más optimizados de estos composites cuando actúan como electrodos en baterías Li/S.

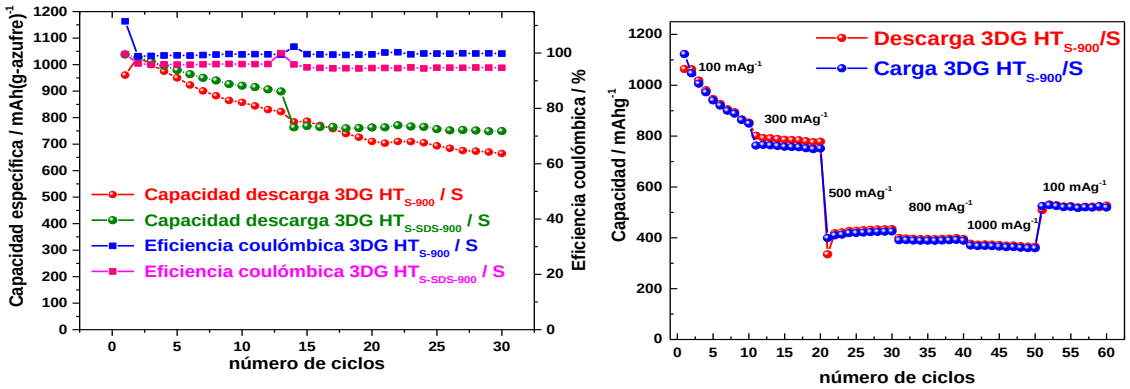


Figura 1. Estudio de la capacidad frente al número de ciclos a velocidad constante (a) y rate capability (b).

Conclusiones

Para obtener una respuesta electroquímica satisfactoria de los grafenos 3D estudiados como electrodos para baterías Li/S es necesaria una etapa de calcinación previa a su impregnación con azufre. Así mismo, el uso de SDS como aditivo aumenta la superficie específica permitiendo albergar una mayor cantidad de S. El comportamiento electroquímico del composite 3DG $HT_{S\text{-}SDS\text{-}900}$/S fue el mejor en cuanto a valores de capacidad y propiedades de ciclaje. Sin embargo, las medidas se vieron afectadas por cortes de corriente, de ahí la necesidad de optimizarlos.

Bibliografía

[1] H. Wang, X. Yuan, G. Zeng,Y. Wu, *Adv. Colloid Interface Sci.* 221 (2015) 41-59.

[2] A. Manthiram, Y. Fu, S. Chung, C. Zu, *Chem. Rev.* 114 (2014) 11751–11787

[3] N. Moreno, A. Caballero, L. Hernán, J. Morales, *Carbon*, 70 (2014) 241-248.

Capítulo 28. Caracterización del Subproteoma Redox de Scrobicularia plana

Ana María Herruzo Ruiz

Universidad de Córdoba. Facultad /Escuela de Ciencias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa 14071-Córdoba, Spain. E-mail: b22herua@uco.es

Resumen

La contaminación es un fenómeno global de nuestro tiempo, recibiendo un número cada vez mayor de xenobióticos que afectan tanto al hombre como al resto de organismos vivos. El objetivo de este proyecto es el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes en la Coquina de fango *Scrobicularia plana*, presente en las cercanías del Parque Nacional de Doñana (PND). Por esta razón, se emplearon herramientas bioquímicas como indicadores tempranos de daño en el medio ambiente. Resultados previos mostraban el papel clave que el estrés oxidativo tiene en la toxicidad de contaminantes, por ello se caracterizó el subproteoma redox. Se analizaron tanto coquinas expuestas en condiciones controladas a metales pesados (arsénico, As) cómo coquinas capturadas en los sedimentos del Estuario del Guadalquivir. Las proteínas fueron aisladas de glándula digestiva de coquinas de fango recogiéndose al menos tres réplicas biológicas de cada una de las condiciones de estudio. Se realizó un marcaje fluorescente selectivo de los tioles oxidados y reducidos, posteriormente se separaron mediante electroforesis y cuantificaron. Además, se estudió la carbonilación y la fosforilación de proteínas, ambos procesos están influenciados por la oxidación proteica, y pueden ser utilizados como indicadores de estrés oxidativo.

Fundamento y Metodología

El objetivo de este proyecto es el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes en la coquina de fango *S. plana*, empleando herramientas bioquímicas como indicadores tempranos de daño en el Medio Ambiente. Para ello se utilizaron tanto coquinas expuestas en condiciones controladas a As, cómo coquinas capturadas en el Estuario del Guadalquivir. Las coquinas de fango fueron muestreadas manualmente, se diseccionaron aislando su glándula digestiva que se congeló rápidamente en N_2 líquido. Finalmente, serían almacenadas a -80ºC hasta su procesamiento. Se caracterizó el subproteoma redox, la carbonilación y fosforilación de proteínas.

Primeramente, se realizó un marcaje fluorescente selectivo de los tioles oxidados y reducidos de las proteínas con yodoacetamidafluoresceína (IAF). Para detectar carbonilos en proteínas, se empleó el marcaje específico con fluoresceína-5-tiosemicarbazida (FCT). El marcaje de fosfo-proteínas se realizó mediante la tinción específica de Pro-Q Diamond. En todos los casos, las proteínas solubles se separaron por electroforesis unidimensional y los geles fueron analizados con el sistema Image Lab 4.1 de Bio-Rad.

Resultados

Los procedimientos experimentales comentados en el apartado anterior fueron empleados para evaluar las proteínas en muestras procedentes de dos localizaciones dentro del PND, como se puede observar en la siguiente imagen.

Los estudios del subproteoma redox se llevaron a cabo en 15 réplicas biológicas de cada localización. Debido a su pequeño tamaño se unieron en tres grupos de 5 individuos cada uno, obteniendo al final tres réplicas biológicas para cada muestra problema.

La cantidad de proteínas disponibles extraídas de muestras de *S. plana* son limitadas; esto implica que únicamente un análisis global de las modificaciones postraduccionales de las proteínas es posible.

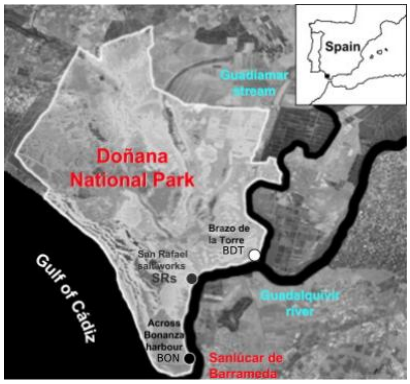


Ilustración 1. Mapa del Parque Nacional de Doñana. Se indican las localizaciones geográficas de las zonas de recogida de muestras, Brazo de la Torre (BDT) y Bonanza (BON).

En las Ilustraciones 2 y 3 se muestras los resultados obtenidos para la determinación de carbonilos y fosfoproteínas presenten en las muestras, tanto en las tres réplicas biológicas como los resultados globales. La carbonilación de proteínas es una de las modificaciones oxidativas más comunes, podemos observar una disminución significativa de los carbonilos proteicos en las muestras procedentes de Bonanza, con respecto a los extraídos en Brazo de la Torre. En el caso de la fosforilación de proteínas, también encontramos una disminución significativa en el total de fosfoproteínas en las muestras procedentes de Bonanza.

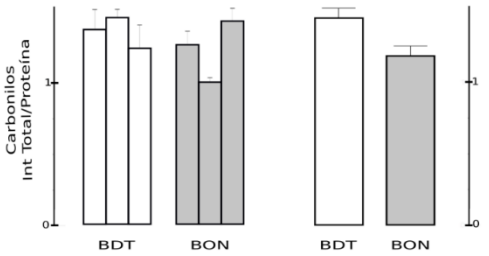


Ilustración 2. Determinación de Carbonilos. Se ha representado la intensidad total obtenida en geles separados por electroforesis 1D entre cantidad de proteína. Se muestran los resultados de las réplicas biológicas (izquierda), y su media correspondiente (derecha). Abreviaturas: Brazo de la Torre (BDT), Bonanza (BON).

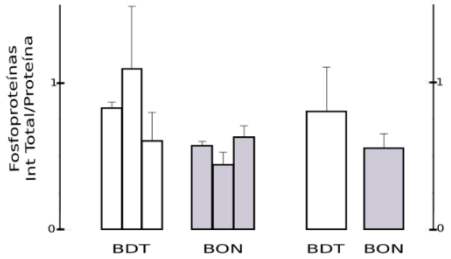


Ilustración 3. Determinación de Fosfoproteínas. Se ha representado la intensidad total obtenida en geles separados por electroforesis 1D entre cantidad de proteína. Se muestran los resultados de las réplicas biológicas (izquierda), y su media correspondiente (derecha). Abreviaturas: Brazo de la Torre (BDT), Bonanza (BON).

Estos resultados fueron complementados con el análisis de los tioles, tanto oxidados como reducidos como se muestran en las Ilustraciones 4 y 5. La oxidación de los grupos tioles de las proteínas es un indicador común de la aparición de estrés oxidativo. En las Ilustración 4 se muestran las diferencias en los geles unidimensionales en los tioles oxidados y reducidos en dos localizaciones a lo largo del estuario de Doñana. Se puede observar un mayor número de bandas/intensidad correspondientes a tioles oxidados en las muestras de Bonanza, mientras que en el caso de los tioles reducidos, las bandas son más numerosas/densas en las muestras de Brazo de la Torre. En la Ilustración 5 se puede observar que la relación tioles oxidados/tioles reducidos sufre un aumento significativo en las coquinas provenientes de Bonanza con respecto a Brazo de la Torre.

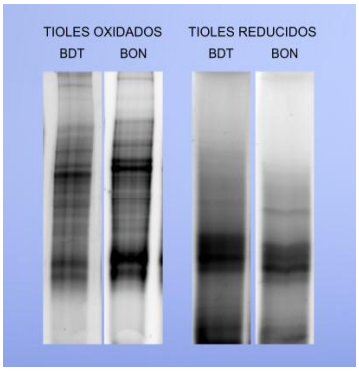


Ilustración 4. Geles unidimensionales de Tioles Ozxidados y Reducidos. Se muestran los resultados de la electroforesis de tioles oxidados (izquierda) y reducidos (derecha) en dos localizaciones, Bonanza (BON) y Brazo de la Torre (BDT)

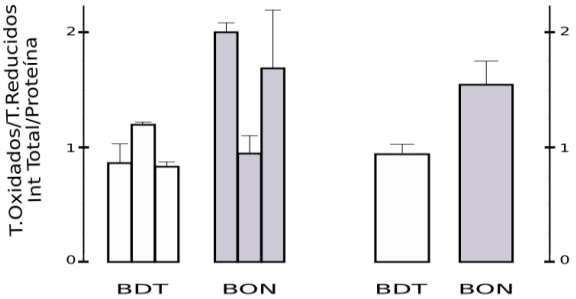


Ilustración 5. Determinación de la relación de Tioles Oxidados y Reducidos. Se ha representado la relación entre los tioles oxidados y reducidos mediante la intensidad total entre cantidad de proteína. Se muestran los resultados de las réplicas biológicas (izquierda) y su media correspondiente (derecha). Abreviaturas: Brazo de la Torre (BDT), Bonanza (BON)

Finalmente se realizó un estudio de exposición controlada; para ello Coquinas de Fango recogidas del Estuario del Guadalquivir fueron expuestas a diferentes concentraciones de As bajo condiciones controladas en el laboratorio, y los resultados se analizaron a distintos tiempos. Los resultados se pueden observar en la Ilustración 6. La exposición a Arsénico a concentraciones de 10 µg/L produce un aumento de los tioles oxidados a largo del tiempo, sin embargo, cuando la concentración es de 100 µg/L el aumento en los tioles oxidados sólo es significativo a los 7 días.

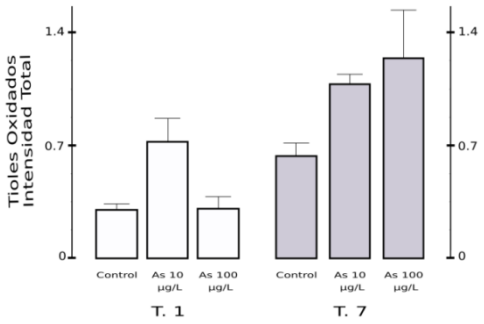


Ilustración 6. Determinación de Tioles Oxidados tras tratamiento con Arsénico. Se ha representado la intensidad total obtenida en geles separados por electroforesis 1D. Se muestran los resultados para dos tiempos, 1 y 7 días de tratamiento, y para dos concentraciones de Arsénico, 10 y 100 µg/L, ambos tiempos con su correspondiente control.

Conclusiones

- Los niveles de carbonilación y fosfoproteínas sufren una disminución significativa en Coquinas de fango de la zona de Bonanza con respecto a Brazo de la Torre.

- La relación entre tioles oxidados y reducidos aumenta en el caso de Bonanza, implicando un aumento de los tioles oxidados en esta localización, una disminución de los tioles reducidos o ambos sucesos al mismo tiempo. Esto puede estar relacionado con un mayor estrés y contaminación ambiental en los organismos presentes en la zona de Bonanza en relación a Brazo de la Torre.

- Estudios de exposición controlada muestran un aumento creciente de los tioles oxidados a lo largo del tiempo cuando organismos como *S. plana* se someten a la presencia de metales pesados como Arsénico.

Bibliografía

[1] Montserrat Solé, Kopecka-Pilarczyk Justyna, Blasco Julián (2009). Pollution biomarkers in two estuarine invertebrates, Nereis diversicolor and Scrobicularia plana, from a Marsh ecosystem in SW Spain. Environment International 35: 523-531.

[2] Romero-Ruiz Antonio, Alhama José, Blasco Julián, Gómez-Ariza José Luis, López-Barea Juan (2008). New metallothionein assay in *Scrobicularia plana*: Heating effect and correlation with other biomarkers. Environmental Pollution 156: 1340-1347.

[3] Romero-Ruiz Antonio, Amezcua Oscar, Rodríguez-Ortega Manuel J., Muñoz José L., Alhama José, Rodríguez-Ariza Antonio, López-Barea Juan (2003). Oxidative stress biomarkers in bivalves transplanted to the Guadalquivir estuary after Aznalcóllar spill. Environmental Toxicology and Chemistry 22: 92-100.

Capítulo 29. Funcionalización Superficial de Sustratos Metálicos para la Obtención de Materiales Biocompatibles

Irene Humanes Pérez

Universidad de Córdoba. Facultad /Escuela de Ciencias. Departamento de Química Física.

Ed. Marie Curie, 2ª Planta, Campus de Rabanales. E-mail: q12hupei@uco.es

Resumen

Las monocapas autoensambladas (SAMs) funcionalizadas suponen un enfoque a la adaptación de las propiedades de la superficie de metales, en particular, aquellas relacionadas con la hidrofilicidad e hidrofobicidad así como las que permiten su aplicación en sistemas biológicos tanto en biosensores como en reacciones de reconocimiento molecular.

En este trabajo, se ha planificado el estudio de capas moleculares que contienen grupos amino terminales con el objetivo de obtener materiales biocompatibles. Estos grupos constituyen ejemplos interesantes de funcionalización superficial que son útiles para diversos fines. El trabajo se ha enfocado en el estudio de la caracterización de la SAM formada por 6-amino-1-hexanotiol (AHT-SAM) como un ejemplo de comportamiento de una capa simple. El principal interés del trabajo se basa en la capacidad de controlar la organización de tales moléculas con el fin de funcionalizar la superficie.

Mediante el uso de técnicas electroquímicas tales como voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia se obtiene información sobre la estabilidad y la integridad de la capa. Por otra parte, las capas se caracterizan por medidas de ángulo de contacto y la composición y estructura mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.

Fundamento

Las monocapas autoensambladas (*self-assembled monolayers*: SAMs) son ensamblajes orgánicos formados por la adsorción espontánea de moléculas desde una disolución o fase gaseosa en la superficie de un sólido. Las SAMs de alcanotioles ω-funcionalizados representan el ejemplo más interesante para adaptar los metales a los diferentes medios, en particular para los sistemas biológicos. De esta manera puede actuarse sobre propiedades como son humectabilidad, hidrofobicidad y densidad de carga, que son de la mayor importancia en la definición de su capacidad de interacción. Debido a su aplicabilidad, estos recubrimientos han sido caracterizados ampliamente en las últimas décadas por una variedad de métodos experimentales y teóricos, y sus propiedades y aplicaciones también se han revisado de manera comprensible [1,2,3].

Las SAMs que poseen grupos amino terminales constituyen un ejemplo interesante de funcionalización de la superficie ya que el conocimiento de las propiedades de estas SAMs es esencial para la mayoría de aplicaciones. La carga superficial de éstas controla las interacciones electrostáticas con otros materiales y además son superficies adecuadas para la inmovilización de entidades químicas y biológicas a través de unión química o física [4,5].

Metodología

Las medidas electroquímicas se realizaron con una celda Metrohm, utilizándose una configuración de tres electrodos: un electrodo auxiliar de Pt, un electrodo de referencia de calomelanos con KCl 50 mM y el electrodo de trabajo de oro. Todos los potenciales medidos en este trabajo se refieren a este electrodo de referencia. Las medidas electroquímicas se han realizado eliminando previamente el oxígeno disuelto mediante burbujeo de una corriente de gas nitrógeno durante 10 minutos.

Antes de cada experimento, se sigue un protocolo de limpieza del electrodo de trabajo mediante voltamperometría cíclica. Para ello, se utiliza una disolución de $HClO_4$ 10 mM y se aplican tantos barridos como sean necesarios (entre -0,4 V y 1,35 V) a una velocidad de 0,1 V/s, hasta obtener un perfil estable.

La formación de la SAM de AHT se ha realizado sumergiendo el electrodo de oro limpio en una disolución de AHT (0,5 mM) en etanol durante 24 h. Posteriormente se retira de la disolución y se lava con etanol y con agua ultrapura.

Resultados

Con el objeto de comprobar que se ha conseguido la formación de una SAM a través de la interacción con el grupo SH de la molécula de AHT con el sustrato de Au, se ha realizado un estudio de la desorción reductiva de la monocapa formada.

En la Figura 1 se muestra el perfil corriente-potencial correspondiente a dicho proceso para un electrodo de Au en una disolución 0.1 M KOH. La reacción que tiene lugar en la desorción reductiva se puede expresar [6,7,8]:

$$R\text{-}S\text{-}Au + 1e^- \longrightarrow Au^o + R\text{-}S^-$$

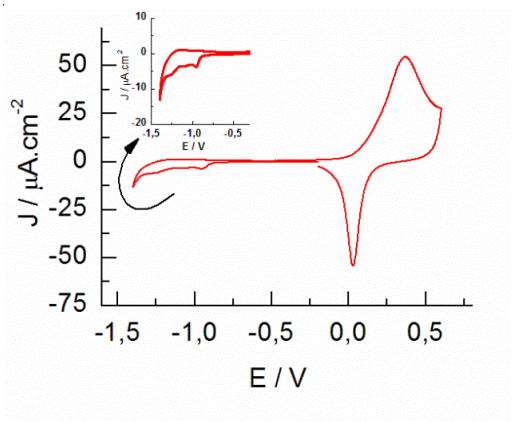


Figura 1. Curva I-E del proceso de desorción reductiva de una SAM de AHT en KOH 0,1 M. v = 0.02 V/s.

Realizando un estudio en función del pH, la situación se vuelve más compleja debido a que las moléculas que forman la SAM poseen un segundo grupo funcional que puede protonarse o disociarse, como es el grupo funcional ($-NH_2$). Con este trabajo se obtiene información sobre la influencia de los pKs de la molécula en el proceso de desorción de la SAM y, más importante, sobre el estado de protonación de las moléculas de AHT que forman la SAM. Recogiéndose los voltamperogramas cíclicos obtenidos para la desorción de la AHT-SAM en función del pH de la disolución, se puede ver que el potencial de desorcion del primer pico se desplaza hacia más negativo a medida que aumenta el pH. Además, puede observarse que los potenciales de pico muestran una variacion lineal que describe tres tramos con diferentes pendientes:

pH < 6 $\partial E_p/\partial pH$ = -58 mV/pH

$Au\text{-}S\text{-}R\text{-}NH_3^+ + 1\ e^- \rightarrow Au^0 + {}^-S\text{-}R\text{-}NH_3^+$

${}^-S\text{-}R\text{-}NH_3^+ + 1\ H^+ \rightarrow HS\text{-}R\text{-}NH_3^+$

6 < pH < 9 $\partial E_p/\partial pH$ = -20 mV/pH

$Au\text{-}S\text{-}R\text{-}NH_3^+ + 1\ e^- \rightarrow Au^0 + {}^-S\text{-}R\text{-}NH_3^+$

${}^-S\text{-}R\text{-}NH_3^+ \rightarrow HS\text{-}R\text{-}NH_2$

pH > 9 $\partial E_p/\partial pH$ = -45 mV/pH

$Au\text{-}S\text{-}R\text{-}NH_2 + 1\ e^- \rightarrow Au^0 + {}^-S\text{-}R\text{-}NH_2$

${}^-S\text{-}R\text{-}NH_2 + 1\ H^+ \rightarrow HS\text{-}R\text{-}NH_2$

La capacidad de una monocapa para bloquear la transferencia electrónica entre la superficie del electrodo de oro y un donador o aceptor de electrones en la disolución se ha demostrado que es una medida de la falta de defectos en la monocapa. Con el objeto de examinar las propiedades bloqueantes del electrodo modificado, se ha llevado a cabo el estudio de la transferencia electrónica de diferentes sondas redox en presencia de la SAM. En presencia de la sonda redox $K_3Fe(CN)_6$ puede observarse que el comportamiento mostrado es el esperado para un proceso quasi-reversible, es decir, no bloquea la transferencia electrónica. En cambio, en el caso de la sonda redox $Ru(NH_3)_6Cl_3$,el comportamiento que se observa es totalmente diferente, produciéndose un bloqueo casi total de la superficie del oro en presencia de la SAM.

Para la caracterización de esta capa se ha llevado a cabo una valoración de pH mediante medidas de ángulo de contacto. Ya que mediante esta técnica se ha evaluado la hidrofilicidad de la misma. Destacándose la sensibilidad de la técnica al carácter hidrofílico de esta superficie, observándose una diferencia en la humectabilidad en torno a 9 º y un pK de disociación de 6.4.

Por último, con el objeto de estudiar la composición de la SAM se ha utilizado espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Un análisis simple de los datos permite determinar una proporción de S:N de 1:1 mientras que la de S:N:C es 1:1:7 que es algo mayor que la teórica, 1:1:6, debido a una posible contaminación de la muestra con el medio.

Conclusiones

- Los resultados de espectroscopía XPS, junto con los de voltamperometría cíclica en la zona de desorción reductiva permiten asegurar la formación de las capas AHT-SAM.

- La capa AHT-SAM, exhibe propiedades bloqueantes frente a la sonda redox $Ru(NH_3)_6Cl_3$. El efecto bloqueante se debe fundamentalmente al estado de carga de los grupos amino terminales.

- Este estudio con voltamperometría cíclica en función del pH, pone de manifiesto que las capas con grupos funcionales amino no exhiben una organización ideal en la interfase.

Bibliografia

[1] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Chem. Rev. 105 (2005) 1103.

[2] A. Ulman, Chemical Reviews 96 (1996) 1533.

[3] E. Pensa, E. Cortes, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M.H. Fonticelli, G. Benitez, A.A. Rubert, R.C. Salvarezza, Accounts of Chemical Research 45 (2012) 1183.

[4] S.G. Thakurta, A. Subramanian, Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects 414 (2012) 384.

[5] R.R. Bhat, J. Genzer, B.N. Chaney, H.W. Sugg, A. Liebmann-Vinson, Nanotechnology 14 (2003) 1145.

[6] Y.Z. Dong, S. Abaci, C. Shannon, M.J. Bozack, Langmuir 19 (2003) 8922.

[7] M.M. Walczak, D.D. Popenoe, R.S. Deinhammer, B.D. Lamp, C.K. Chung, M.D. Porter, Langmuir 7 (1991) 2687.

[8] C.A. Widrig, C. Chung, M.D. Porter, J. Electroanal. Chem. 310 (1991) 335.

Capítulo 30. Cambios en los Perfiles Transcripcionales de Citocromos P450 en Ratones Mus spretus Expuestos a p,p'-DDE

Sara López-Bellón, Noelia Morales-Prieto y Nieves Abril

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.

Campus de Rabanales. 14071-Córdoba, Spain. E-mail: b22lobes@uco.es

Resumen

El DDT (1,1,1-tricloro-2, 2-bis (p-clorofenil) etano) es un pesticida organoclorado (POC) cuyo metabolismo genera derivados aún más tóxicos, como el p,p'-DDE (1,1-dicloro-2,2-bis[p –clorofenil] etileno), un mimético hormonal, generador de especies reactivas de oxígeno (ERO) y actividad antiandrogénica. No se conocen los mecanismos moleculares de la toxicidad del p,p'-DDE, por lo que su estudio resulta de gran interés. El hígado es el órgano encargado del metabolismo del p,p'-DDE, mediante enzimas como los citocromos P450 (CYP). Analizando los cambios en los perfiles transcripcionales de un grupo de citocromos hemos encontrado un claro dimorfismo sexual, tanto en los niveles basales como en los cambios de expresión provocados por p,p´-DDE. Por la naturaleza de las reacciones que catalizan los citocromos cuyos perfiles transcripcionales cambian por exposición a p,p´-DDE, proponemos que las alteraciones causadas en el metabolismo de hormonas sexuales son responsables de los efectos antiandrogénico y prooxidante de este pesticida. La intensidad de los cambios sugiere una mayor resistencia a daños por p,p´-DDE en las hembras, lo cual concuerda con lo observado en la evaluación histopatológica realizada. Estos citocromos pueden ser utilizados como biomarcadores tempranos de exposición.

Fundamento

El uso de DDT en agricultura fue prohibido hace más de 40 años, pero ha vuelto a usarse para controlar los insectos que transmiten enfermedades (malaria, Zika). En consecuencia, el metabolito p,p'-DDE continúa siendo detectado en muestras de suero y materia grasa en muchas poblaciones humanas y animales en todo el mundo, por exposición directa o mediante el consumo de alimentos, como pescado y fruta, procedentes de estas zonas. El p,p'-DDE se comporta como un potente antiandrógeno y se piensa que el estrés oxidativo también participa en la toxicidad inducida por p,p'-DDE. Sin embargo, los mecanismos moleculares y los procesos patogénicos que subyacen a la toxicidad del p,p'-DDE son poco conocidos. Este trabajo se ha centrado en el análisis del efecto de la exposición a p,p´-DDE sobre los niveles de transcritos de enzimas biotransformadoras de la familia de los citocromos P450 en hígado de ratón de ambos sexos, para clarificar el papel que pudiera tener esta variable en las respuestas a este pesticida, obtener nueva información sobre los mecanismos de su toxicidad e identificar nuevos biomarcadores de exposición que puedan ser usados en programas de evaluación de salud medioambiental.

Metodología

- ***Animales, tratamientos y muestras:*** Se emplearon ratones *Mus spretus* que se alimentaron con pienso Harlan™ triturado mezclado con aceite refinado de maíz (3 ml/100 g de pienso), al que se añadió *p,p'*-DDE (SUPELCOĠ Analytical, SIGMA-ALDRICH) (ingesta diaria 150 mg/kg de peso corporal y día) durante 30 días. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y seguidamente se extrajo el hígado, que se guardó a -80ºC hasta su uso.

- ***Evaluación histopatológica:*** Se realizaron cortes histológicos del lóbulo superior del hígado, que se procesaron en parafina y tiñeron con hemotoxilina-eosina.

- ***Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA:*** Se extrajo RNA total utilizando el kit comercial *AllPrep® DNA/RNA/Protein* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Solo se utilizó RNA de gran pureza e integridad. Para la síntesis de cDNA se usaron 2 µg de RNA total y la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen).

- ***Cuantificación de transcritos por qRT-PCR en tiempo real:*** Las reacciones se llevaron a cabo por cuadruplicado, utilizando protocolos optimizados por nuestro grupo. Los cebadores amplificaron de modo específico y con gran eficiencia las secuencias diana. Los valores absolutos de transcritos de cada gen estudiado se obtuvieron extrapolando los valores de C_T obtenidos sobre una recta patrón.

Resultados

- ***Evaluación histopatológica de muestras hepáticas***

La Fig. 1 muestra que los animales control presentaron una estructura histológica normal, donde las células se organizan regularmente en lóbulos alrededor de una vena central, y la mayoría de los hepatocitos son mononucleados. En los grupos tratados con p,p´-DDE se apreció degeneración hidrópica, con hepatocitomegalia y ligero agrandamiento de los núcleos; también se observó un incremento en el número de células binucleadas, que puede indicar proliferación regenerativa del tejido dañado.

La comparación de machos y hembras mostró claramente un mayor efecto del p,p´-DDE en machos, donde el número de hepatocitos balonizados en muy superior. Este resultado

claramente sustenta la idea de que la toxicidad de este pesticida se ve influenciada por el sexo. Es posible que estas diferencias histológicas entre machos y hembras de M. spretus se deban a variaciones en la regulación de la expresión de enzimas CYP por hormonas sexuales, como se discutirá en apartados posteriores.

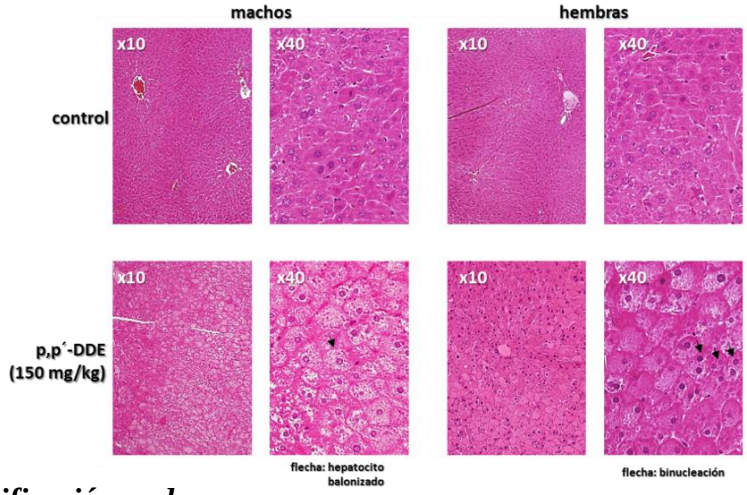


Figura 1. Efecto de la exposición a p,p'-DDE sobre la morfología hepática de ratones M. spretus machos y hembras (Hematoxilina-eosina, amplificación indicada en la imagen).

- ***Cuantificación de transcritos por qRT-PCR en tiempo real***

La qRT-PCR es la técnica de elección para la cuantificación de transcritos. Esta metodología exige una cuidadosa optimización para obtener resultados significativos y reproducibles.

Se estudiaron los perfiles transcripcionales basales de 7 citocromos en hígado de machos y hembras de ratones M. spretus expuestos a p,p´-DDE. El número de transcritos de Cyp1A1 es muy escaso (Fig. 2A), especialmente en hembras, lo que resta valor biológico a los cambios observados. Los genes Cyp1A2 y Cyp3A11 presentaron niveles de transcritos muy altos y similares en machos y hembras. CYP1A2 participa en el metabolismo de estrógenos y testosterona, lo que explicaría los parecidos niveles basales en ambos sexos. La familia de citocromos CYP3A metaboliza más del 50 % de los compuestos químicos administrados como fármacos. Cyp2A5 está relacionado con enfermedades hepáticas y estrés oxidativo, lo mismo que Cyp2B9 que además está bajo control multihormonal. CYP2E1 está implicado en la toxicidad y carcinogenicidad de muchos xenobióticos, además de lípidos que actúan como segundos mensajeros en procesos de señalización celular e inflamación. Se sabe que la expresión de esta enzima está regulada por hormonas esteroides femeninas lo cual concuerda con los niveles basales de transcritos de Cyp2E1 superiores en hembras. Cyp4A10 predomina en hígado de ratones hembra, regulada por andrógenos y por GH del modo descrito para CYP2B9. Esto concuerda con los mayores niveles de transcritos de esta isoforma hallados en nuestros ratones hembra e indicaría un mejor funcionamiento en el metabolismo de ácidos grasos y eicosanoides, así como en la homeostasis y señalización lipídica.

Todos los citocromos estudiados, excepto Cyp1A1 y Cyp2E1, alteraron sus niveles de transcritos a consecuencia del tratamiento (Fig. 2B). Se encontró un descenso significativo en el número de transcritos de Cyp1A2 en machos. CYP1A2 participa en la destoxificación de xenobióticos y en la 2-hidroxilación del estradiol, que anula sus propiedades tóxicas y carcinogénicas. Su disminución potenciaría la acumulación de estradiol y su conversión en el derivado 4-hidroxilado, con efectos femineizantes y de promoción de cáncer. Los niveles de transcritos Cyp3A11 y Cyp4A10 se incrementaron ligeramente por acción del p,p´-DDE, especialmente en hembras. CYP3A11 cataliza la 6-β-hidroxilación de la testosterona, causando la disminución de los niveles de esta hormona y contribuyendo a su capacidad anti-androgénica. Por su lado CYP4A10 participa en el metabolismo de ácidos grasos y eicosanoides y su incremento podría relacionarse con la alta concentración de ácidos grasos libres asociada a la exposición a p,p´-DDE. Los incrementos causados por p,p´-DDE en los niveles de transcritos fueron muy considerables para los genes Cyp2A5 y Cyp2B9, siendo muy superior en hembras.

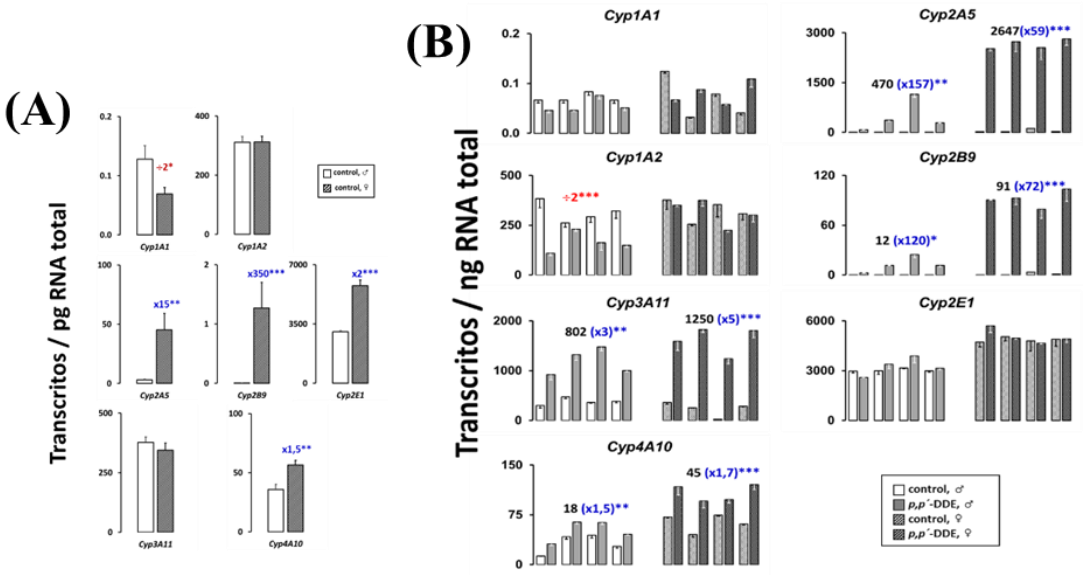


Figura 2. Cuantificación absoluta de transcritos de genes Cyp en hígado de ratones M. spretus. (A) Niveles basales en machos y hembras; (B) efecto de la exposición a p,p´-DDE en individuos de ambos sexos.

Conclusión

Los resultados de este trabajo contribuyen, pues, a esclarecer las bases moleculares (implicación de determinados citocromos) subyacentes a las alteraciones metabólicas causadas por *p,p'*-DDE. Estos genes pueden ser usados como biomarcadores de exposición en programas de evaluación de salud medioambiental.

Bibliografía

[1] Lu, Y. F., T. Jin, Y. Xu, D. Zhang, Q. Wu, Y. K. Zhang and J. Liu (2013). "Sex differences in the circadian variation of cytochrome p450 genes and corresponding nuclear receptors in mouse liver." Chronobiol Int 30(9): 1135-1143.

[2] Mačak-Šafranko, Ž., S. Sobočanec, A. Šarić, T. Balog, V. Šverko, B. Kušić and T. Marotti (2011). "Cytochrome P450 gender-related differences in response to hyperoxia in young CBA mice." Experimental and Toxicologic Pathology 63(4): 345-350.

[3] Tsuchiya, Y., M. Nakajima and T. Yokoi (2005). "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." Cancer Lett 227(2): 115-124.

Capítulo 31. Calibración de un monocromador

María del Carmen López Cosano

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Física Aplicada.

Campus de Rabanales. Edificio C2 Albert Einstein. Ctra. Madrid km 396. 14071 (Córdoba).
E-mail: maricosanof@gmail.com

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo llevar a cabo la calibración de un monocromador, en concreto un monocromador JYH 1000M. Por calibración se entiende el conjunto de operaciones por las que se establece la correspondencia entre los valores proporcionados por un equipo y los valores conocidos correspondientes a una magnitud de medida o patrón, procediendo a su ajuste o corrección por medio de tablas o curvas de corrección. Este tipo de procesos es conveniente realizarlos antes de utilizar por primera vez un equipo, así como tras un cierto tiempo y de forma periódica para garantizar la validez de las medidas.

Un monocromador, por su parte, es un dispositivo óptico que recoge radiación lumínica y la descompone en las distintas longitudes de onda de las que está compuesta a través de una red de difracción y permitiendo seleccionar una banda estrecha de longitudes de onda.

La calibración se realiza mediante la obtención de la respuesta del sistema, que puede hallarse comparando la radiación emitida teóricamente por la fuente patrón con la registrada instrumentalmente. Como fuente patrón en este estudio se ha utilizado una lámpara halógena, obteniendo su espectro haciendo pasar la luz emitida por la misma a través del monocromador.

Fundamento

Un monocromador es un instrumento que descompone la radiación lumínica que recoge en las distintas longitudes de onda que la componen [1,2]. Este trabajo se ha centrado en la calibración del mismo en intensidad.

Esta calibración se lleva a cabo comparando la señal teórica emitida por una fuente patrón con la registrada experimentalmente por el monocromador.

La intensidad del espectro de una fuente patrón a una temperatura T, viene dada por su radiancia espectral, (λ,T):

$$E(\lambda,T) = \tau \cdot \varepsilon(\lambda,T) \cdot \rho(\lambda,T) \qquad (1)$$

τ es un factor de absorción del material del que está recubierta la fuente patrón, (λ,T) es la emisividad de la fuente patrón, y ρ(λ,T) es la radiación del cuerpo negro, dada por la Ley de Planck:

$$\rho(\lambda,T) = \frac{2hc^2}{\lambda^5} \frac{1}{e^{\frac{hc}{\lambda kT}-1}} \qquad (2)$$

donde h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz, λ es la longitud de onda, k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura.

Nuestro sistema óptico de detección responde de forma diferente para las distintas longitudes de onda, de ahí que sea necesario obtener la curva de respuesta espectral del sistema: R(λ).

La intensidad lumínica detectada por el sistema óptico I_{med}, será proporcional a este factor (λ) de la siguiente manera:

$$I_{med}(\lambda) = G \cdot R(\lambda) \cdot I_{emi}(\lambda,T) \qquad (3)$$

siendo G un factor que da cuenta de la geometría del sistema. De este modo, para una geometría dada, el cociente I_{med}/I_{emi} nos da la respuesta en intensidad del sistema para el intervalo de longitudes de onda considerado y en unidades arbitrarias.

Metodología

A continuación se describen los pasos necesarios para llevar a cabo la calibración, con la que se ha calculado la intensidad real de un plasma de Ar, del que se han obtenido medidas para una serie de líneas espectroscópicas en el espectro a unas longitudes de onda concretas, a fin de comprobar la validez de la calibración.

1. <u>Registro del espectro emitido por el plasma de argón.</u>

Mediante el monocromador se registró el espectro emitido por el plasma y se calculó la intensidad realizando una integral sobre el perfil de la línea. La fibra por medio de la cual el monocromador capta la luz se situó a 0.5 cm de distancia del haz.

2. <u>Cálculo de la intensidad del espectro emitido por la fuente patrón.</u>

Se utilizó como fuente patrón una lámpara halógena comercial, en concreto el modelo GY 6.35. Para esta lámpara la emisividad se considera igual a la unidad por lo que su radiancia ((λ,T)) puede considerarse igual a la de un cuerpo negro a la temperatura de trabajo de la lámpara: 3000K. La radiancia teórica de un cuerpo negro viene dada por la ecuación (2).

3. Registro del espectro emitido por la fuente patrón mediante el monocromador.

Se registró un espectro de la emisión de radiación de la fuente patrón por medio del monocromador. La fibra óptica se situó a 4.5 cm de la fuente en el momento de la medición.

4. Respuesta espectral del sistema óptico.

Partiendo de la ecuación (3) se despeja el factor de respuesta $G\cdot(\lambda)$ y, para las distintas longitudes de onda, se toman los valores de la intensidad de la fuente patrón obtenidos del monocromador y se realiza el cociente de esta con los valores teóricos para la emisividad del cuerpo negro.

5. Obtención de la intensidad real emitida por el plasma.

Una vez adquiridos todos los datos necesarios, se procede al cálculo de la intensidad real que emite el plasma, para lo cual se despeja la respuesta espectral de la ecuación (3) y de esa misma ecuación trasladada al caso del plasma e igualando:

$$I_{real\ plasma} = \frac{G_{lamp}}{G_{plasma}} \frac{I_{med\ plasma}\cdot I_{emi\ lamp}}{I_{med\ lamp}} \qquad (4)$$

Finalmente, introduciendo en la ecuación (4) un factor 10^{-6}, para la coherencia entre las unidades de las diferentes magnitudes, y el factor $(\frac{4.5}{d_{f-p}})^2$, que solventa la diferencia de geometría y que proviene de la ley inversa de los cuadrados [3,4], se puede calcular la intensidad real emitida por el plasma:

$$I_{real\ plasma} = \frac{I_{med\ plasma}\cdot I_{lamp\ emi}}{I_{lamp\ med}\cdot(\frac{4.5}{d_{f-p}})^2}\cdot 10^{-6} \qquad (5)$$

6. Comprobación de la validez de los resultados.

Por último, una vez realizada la calibración, se calculan algunos parámetros característicos del plasma para comprobar la validez del resultado de la calibración frente a los resultados que se obtendrían sin calibrar. Las intensidades de las líneas espectrales a las que se aplica la calibración obtenida se corresponden con determinadas transiciones atómicas del Ar, pudiendo así calcular las densidades de población de los niveles superiores de las transiciones que dan lugar a dichas líneas espectrales mediante la expresión: $n_p = \frac{4\pi\lambda I}{hcApq}$ (6); donde n_p es la densidad de población del nivel superior, λ la longitud de onda de la línea considerada, I el área bajo la línea y A_{pq} la probabilidad de transición entre los niveles p y q. Los valores de dicha probabilidad se tomaron de la página web del NIST [5].

Por otra parte, la representación de $\log(\frac{n_p}{g_p})$ frente a E_p de acuerdo con la expresión $\log\left(\frac{n_p}{g_p}\right) = \log\left(\frac{n_l}{g_l}\right) - \log(e)\frac{E_p}{kT_{exc}}$ (7) se denomina diagrama de Boltzmann y si el plasma se encuentra en Equilibrio Termodinámico Local (ETL), los puntos del diagrama se ajustan a una recta cuya pendiente es igual al cociente entre -0.625 y la temperatura de excitación la

cual puede considerarse igual a la temperatura electrónica del plasma. La expresión (7) se refiere a una transición del nivel p al nivel q, siendo el nivel p el de mayor energía y g_p es la degeneración del nivel superior, n_l la población del nivel fundamental, g_l la degeneración del nivel fundamental, E_p la energía del nivel superior de la transición y kT_{exc} es una medida de la energía intercambiada en la transición.

Resultados

Las Figuras 1 y 2 corresponden a los diagramas de Boltzmann obtenidos a partir de los valores de la densidad de estados del Ar una vez aplicado el proceso de calibración y sin haberlo aplicado, respectivamente.

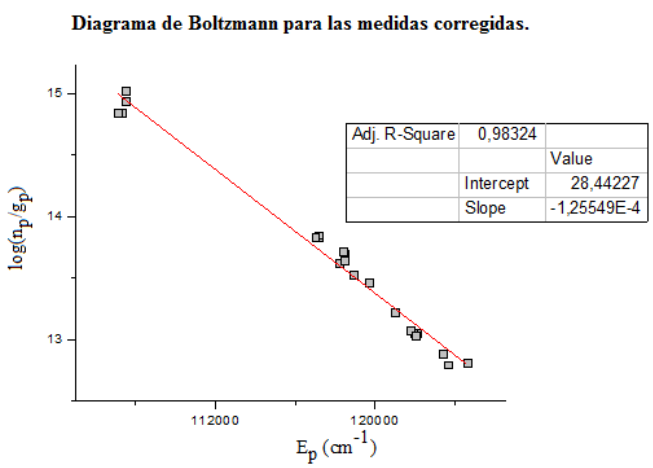


Figura 1. Diagrama de Boltzmann para el caso de las medidas corregidas tras la calibración.

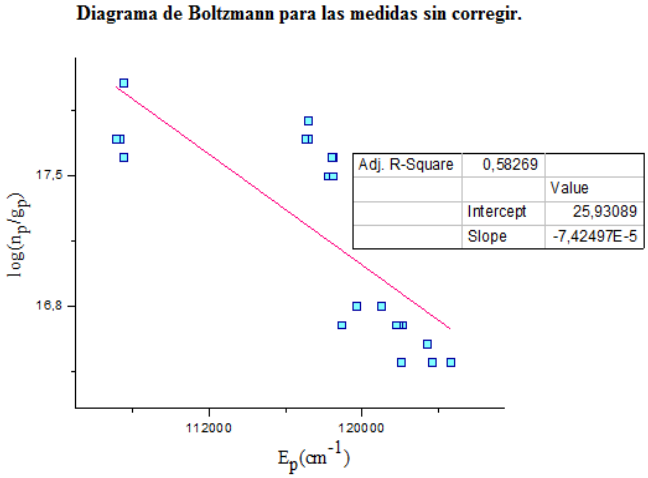


Figura 2. Diagrama de Boltzmann para el caso de las medidas sin corregir, las medidas previas a la calibración.

Los valores de la temperatura electrónica hallada para el caso de las medidas corregidas fue $T_{e\ corregidas} = 4980 \pm 150\ K$, mientras que la temperatura electrónica para el caso de las medidas sin corregir resultó: $T_{e\ sin\ corregir} = 8400 \pm 1600K$. Puede observarse como la no aplicación de la respuesta del sistema óptico a las intensidades registradas por el monocromador da lugar a obtener valores de temperatura sobreestimados lo que lleva a conclusiones erróneas en relación al comportamiento físico del plasma.

Conclusiones

Por los resultados obtenidos, se puede observar que el diagrama de Boltzmann se ajusta mucho más a una recta en el caso de las medidas corregidas, habiendo una diferencia en la temperatura electrónica hallada para cada caso de más de 3000K.

Como conclusión a este trabajo podemos extraer que realizar o no la calibración cambia por completo los resultados, en este caso las características del plasma, quedando patente la gran importancia de llevar a cabo un calibrado correcto de los instrumentos que se emplean en laboratorio.

Bibliografía

[1] R. Rincón Liévana, Caracterización de un plasma torch tipo TIAGO y su aplicación al área medioambiental, 2013.
[2] U. de La Rioja, Colorímetros De Filtros, pp.1-24.
[3] C. Yubero Serrano, Calibración del sistema óptico de detección de radiación utilizado en Espectroscopía de Emisión, Universidad de Córdoba, 2005.
[4] D. Rodríguez Caballero, Calibración de un monocromador, Universidad de Córdoba, 2016.
[5] NIST Atomic Ionization Energies Output." [Online]. Available: http://physics.nist.gov/cgi-bin/ASD/ie.pl. [Accessed: 12-Jun-2015].

Capítulo 32. Efecto de factores que afectan al balance C/N sobre la expresión de la fosforibosil amidotransferasa, que cataliza la primera reacción en la síntesis *de novo* de purinas y ureidos.

Cristina Mª López Vázquez

Universidad de Córdoba. Facultad /Escuela de Ciencias. Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología vegetal.

Edificio C-4, Celestino Mutis, Campus de Rabanales. 14071-Córdoba.
Email:b22lovac@uco.es

Resumen

La fosforribosil pirofosfato amidotransferasa (PRAT) es una proteína que cataliza la formación del primer intermediario de la ruta de síntesis *de novo* de purinas, la fosforribosil amida (PRA). En leguminosas ureídicas, como la judía (*Phaseolus vulgaris),* dichas purinas son utilizadas para la síntesis de ureidos y cloroplastos y para la división celular. Por tanto, cualquier situación que influya sobre la funcionalidad de la PRAT, lo hará también en la ruta de síntesis *de novo* de purinas. En plantas adultas esta ruta está activa principalmente en los nódulos, durante la fijación de N_2 atmosférico. Pero existen otras situaciones en las que también hay síntesis *de novo* de purinas, como por ejemplo en la germinación. En ambos casos se dependerá de la funcionalidad de PRAT. En este trabajo se estudió la influencia de la presencia o ausencia de luz durante la germinación y tratamientos con varias concentraciones de nitrato, sobre la regulación de PRAT. La regulación ha sido analizada a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional, empleando PCR cuantitativa, análisis Western-blot y determinación de la actividad respectivamente. Los resultados mostraron una inducción en la expresión de la proteína PRAT en semillas germinadas en oscuridad y en plantas tratadas con bajas concentraciones de nitrato.

Fundamento y presentación de resultados

La hipótesis de este trabajo es que tanto la luz como el aporte de nitrógeno ejercerán un papel regulador de la síntesis *de novo* de purinas, a través de la regulación de la fosforribosil pirofosfato amidotransferasa (PRAT) y ambos afectarán a la disponibilidad de los sustratos de la PRAT. La luz propiciará la síntesis de esqueletos de carbono o carbohidratos utilizados para la síntesis del sustrato (PRPP), mientras que el aporte de nitrógeno, además afectaría a la síntesis de la glutamina y otros aminoácidos que se utilizan para la síntesis *de novo* de purinas. Por tanto, en este trabajo se pretende analizar el efecto que ejerce la luz, durante la germinación de las semillas, así como el efecto del aporte de nitrato sobre la regulación de la expresión y actividad de la proteína *Pv*PRAT y por ende, sobre la síntesis *de novo* de purinas en *Phaseolus vulgaris.*

1. Análisis de la región promotora de los genes PvPTRAT

El análisis de las secuencias del promotor de los tres genes que codifican proteínas PRAT en judía, *PvPRAT1, 2 y 3*, utilizando el software PlantCARE [5], mostró la presencia de abundantes motivos de regulación por luz, que incluían tanto elementos *cis* sensibles a la luz como elementos regulados por ritmos circadianos, etc.

2. Análisis de la funcionalidad de los genes PvPRAT1, 2 Y 3 en cotiledones germinados en luz/oscuridad

En una evaluación preliminar se observó que las semillas germinadas bajo condiciones de oscuridad poseían una radícula y ejes de mayor tamaño que las semillas germinadas en luz. Por otro lado, aquellas semillas germinadas en luz adquirieron un reverdecimiento de sus cotiledones y hojas incipientes, cosa que no ocurría en las semillas germinadas en oscuridad.

En el análisis a nivel transcripcional, realizando una PCR cuantitativa, se determinó que tanto en condiciones de luz como de oscuridad la isoforma *PvPRAT 3* era la que mostraba niveles mayores de expresión en cotiledones. Además, como se muestra en la Fig.1, todos los genes *PvPRAT* tenían una inducción en su expresión al cuarto día después de la imbibición y una reducción en dicha expresión al sexto día. Estos resultados pueden deberse a que, justo en el momento de la germinación, que ocurre entre el tercer y cuarto día, es cuando se requieren mayores niveles de síntesis de proteínas y ARN nuevos [2], necesitando, por tanto una síntesis de purinas mayor. Sin embargo, esta inducción al cuarto día tras la imbibición era más acusada en cotiledones de semillas germinadas en oscuridad, lo cual puede deberse a que en oscuridad no se activan las rutas de síntesis de carbohidratos. Como resultado, la formación del sustrato utilizado por la PRAT para la formación de fosforribosil amida (PRA), el fosforribosil pirofosfato (PRPP), sintetizado a partir de la ribosa-5-fosfato [3], puede verse afectada.

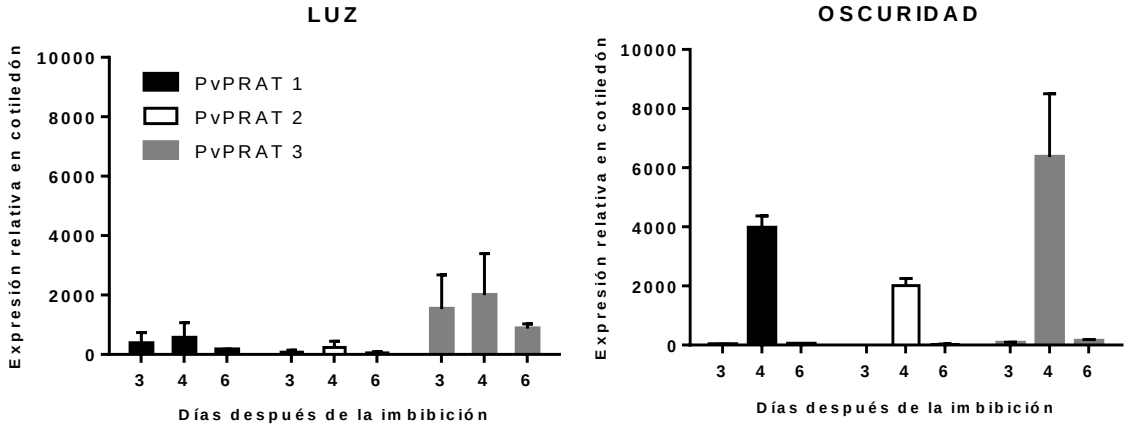


Fig. 1. Expresión relativa de los genes PvPRAT1, 2 y 3 a los 3, 4 y 6 días después de la imbibición y cuando las semillas son germinadas en condiciones de luz y en oscuridad total. Las gráficas son el resultado de los datos obtenidos de tres experimentos independientes.

En el análisis a nivel traduccional, se determinó que, bajo condiciones de luz, la concentración relativa de proteína no tenía su máximo a 4 días después de la imbibición, sino que disminuía de forma gradual conforme avanzaba en su desarrollo. Lo mismo ocurría en los resultados de la determinación de la actividad en condiciones de luz. Esta disminución constante podría deberse a que en luz hay reverdecimiento de las hojas incipientes y es en ellas donde se comienza a sintetizar las purinas necesarias para el desarrollo de la plántula. Por el contrario los cotiledones comenzarían a senescer. En condiciones de oscuridad, la concentración de la proteína se mantenía constante a 3 y 4 días tras la imbibición y disminuía a los 6 días, aunque dicha disminución no era tan acusada como en el caso de las semillas germinadas en condiciones de luz. Sin embargo, la actividad de la proteína *Pv*PRAT aumentaba a 6 días. Esto se relacionaría con que en oscuridad no hay reverdecimiento de los tejidos, causando así un retraso madurativo que desplaza el pico de actividad hasta el sexto día después de la imbibición.

3. Análisis de la funcionalidad de los genes PvPRAT1, 2 y 3 en plantas adultas de P. vulgaris con concentraciones limitadas de nitrato

Los resultados de la Fig. 2 muestran que, en raíz se expresaba mayoritariamente la *PvPRAT 3,* mientras que en hojas trifoliadas lo hacía la *PvPRAT 1* [1,4]. Además, *PvPRAT 3* se indujo en respuesta a condiciones limitantes de nitrato (2mM) en ambos tejidos. Es posible que esto se deba a que cuando hay bajo aporte de nitrato, se produce carencia del otro sustrato utilizado por la proteína *Pv*PRAT, la glutamina. Además, mientras que en raíz la *PvPRAT 1 y 2* mantuvieron niveles constantes de expresión, en 3ª y 4ª hoja trifoliada estas dos isoformas aumentaron cuando la planta disponía de nitrato suficiente (10mM). Esto estaría relacionado con que el tejido foliar adquiere un mayor crecimiento con un mayor aporte de nitrato, de manera que necesitaría de la síntesis de nuevas purinas para llevar a cabo su desarrollo y crecimiento de forma normal.

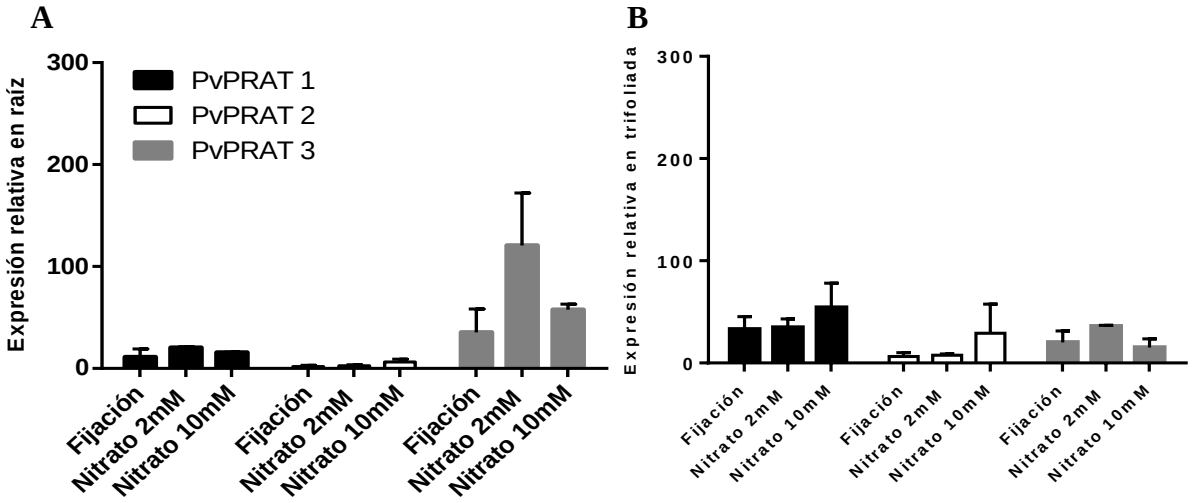


Fig. 2. (A) Expresión relativa de los genes PvPRAT1, 2 y 3 en raíces de P. vulgaris de 28 días en condiciones de fijación de N_2 atmosférico, tratadas con nitrato 2mM y 10mM. (B) Expresión relativa de los genes PvPRAT1, 2 y 3 en la tercera y cuarta trifoliada de P. vulgaris de 28 días en condiciones de fijación de N_2 atmosférico, tratadas con nitrato 2mM y 10mM.

Finalmente, los resultados del análisis a nivel traduccional mostraron que en ambos tejidos la concentración relativa de la proteína *Pv*PRAT apenas variaba, lo cual no coincide con los resultados de la regulación a nivel transcripcional. Esto nos indica que dicha proteína está regulada de forma diferente en ambos niveles cuando hay un mayor y menor aporte de nitrato.

Bibliografía

[1] Coleto I., Trenas A.T., Erban A., Kopka J., Pineda M., Alamillo J.M. (2016) Funtional specialization of one copy of glutamine phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase in ureide production from symbiotically fixed nitrogen in *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell and Environment (en prensa).*

[2] Bewley J.D. (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9:1055-1066.

[3] Hove-Jensen B. (1988) Mutation in the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase gene (prs) that results in simultaneous requirements for purine and pyrimidine nucleosides, nicotinamide nucleotide, histidine, and tryptophan in Escherichia coli. *Journal of bacteriology* 170(3):1148-52.

[4] Hung W.F., Chen L.J., Boldt R., Sun C.W., Li H.M. (2004) Characterization of Arabidopsis Glutamine Phosphoribosyl Pyrophosphate Amidotransferase-Deficient Mutants. *Plant Physiology* 135(3):1314-23.

[5] Lescot M., Déhais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Van de Peer Y., Rouzé P., Rombauts S. (2002) PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, database issue 30: 325-327.

Capítulo 33. Evolución temporal en Mecánica Cuántica usando la aproximación repentina

Milagros Francisca Morcillo Arencibia

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Física.

Edificio "Einstein", planta baja, Campus de Rabanales, 14071, Córdoba. E-mail: f22moarm@uco.es

Resumen

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio de la evolución temporal del átomo de hidrógeno cuando pasa de una situación de confinamiento a estar libre. Como consideramos que el cambio del sistema se produce en un tiempo muy pequeño en comparación a la escala de tiempo asociada a la dinámica del sistema, usamos la aproximación repentina para el análisis de la situación. Consideramos que el átomo está confinado por una barrera esférica e infinita de potencial.

Así, calculamos las probabilidades de transición entre los estados del átomo confinado y del átomo libre.

Finalmente, observamos que un gran confinamiento no es estable dado que su probabilidad de ionización está en torno al 25%.

Metodología

Aproximación repentina para el átomo de hidrógeno

Particularizando la aproximación repentina [1,2] para el átomo de hidrógeno, consideramos que inicialmente está confinado, por lo que el Hamiltoniano inicial es el del átomo de hidrógeno confinado $\widehat{H_c}$

$$\widehat{H_c}=-\frac{1}{2}\nabla^2-\frac{1}{r}+V_c(r). \quad (1)$$

Este está expresado en el sistema de unidades atómicas, el cual usaremos a lo largo de todo el trabajo.

V_c es el potencial de confinamiento que, en nuestro caso, tomamos como una barrera esférica e infinita de potencial

$$V_c(r)=\begin{cases}0, & r<R_c\\ \infty, & r>R_c\end{cases} \quad (2)$$

con R_c como radio asociado a la barrera.

De esta forma, los valores de energía y autoestados iniciales serán los del átomo de hidrógeno confinado, los cuales no son conocidos y vienen dados por la expresión

$$\widehat{H_c}|\psi^a_{nml}\rangle=E^a_n|\psi^a_{nml}\rangle, \quad (3)$$

donde, dada la simetría esférica del potencial, podemos separar las autofunciones $|\psi^a_{nml}\rangle$ en parte radial y parte angular como

$$\langle\vec{r}|\psi^a_{nml}\rangle=R^a_{nl}(r)Y_{lm}(\theta,\varphi). \quad (4)$$

La parte angular $Y_{lm}(\theta,\varphi)$ la representan las funciones conocidas como armónicos esféricos, las cuales pueden consultarse en las referencias [1,2], y la parte radial podemos expresarla según la función de onda radial reducida $\phi^a_{nl}(r)=rR^a_{nl}(r)$, de manera que solo hay que resolver la ecuación diferencial monodimensional [1,2]

$$-\frac{d^2\phi^a_{nl}(r)}{dr^2}+\left(-\frac{2}{r}+2V_c+\frac{l(l+1)}{r^2}\right)\phi^a_{nl}(r)=2E^a_n\phi^a_{nl}(r). \quad (5)$$

El potencial de confinamiento lo que hace es modificar las condiciones de contorno. Al tratarse de una barrera esférica e infinita de potencial, la función de onda radial reducida debe anularse en los extremos de la barrera y fuera de ella, por lo que las condiciones de contorno son

$$\phi^a_{nl}(0)=0, \quad \phi^a_{nl}(R_c)=0. \quad (6)$$

Una vez se produce el cambio abrupto del Hamiltoniano, no teniendo por qué ser la diferencia entre ambos Hamiltonianos necesariamente pequeña, se tiene el átomo de hidrógeno libre. Este problema es conocido [1,2] y su tratamiento es el mismo que para el átomo de hidrógeno confinado excepto por las condiciones de contorno, que en este caso son

$$\phi^d_{nl}(0)=0, \quad \phi^d_{nl}(r\to\infty)=0. \quad (7)$$

Finalmente, la probabilidad de transición entre estados estacionarios del átomo de hidrógeno libre y confinado se calcula como

$$P=\left|\left\langle \psi^{d}_{n'l'm'} \middle| \psi^{a}_{nlm} \right\rangle\right|^2. \quad (8)$$

Cálculo numérico de los estados ligados

El problema que nos ocupa lo tratamos de forma numérica [3]. Para ello, a partir de la ecuación (4) consideramos la ecuación genérica

$$-\frac{d^2\phi(r)}{dr^2}+V(r)\phi(r)=\lambda\phi(r). \quad (9)$$

Tomando un número de intervalos N y los extremos del intervalo que contiene a *r* como R_{min}, R_{max}, definimos un paso de discretización

$$h=\frac{R_{max}-R_{min}}{N}. \quad (10)$$

Si aproximamos la derivada segunda como

$$-\frac{d^2\phi(r)}{dr^2}\approx\frac{-\phi(r-h)+2\phi(r)-\phi(r+h)}{h^2}, \quad (11)$$

obtenemos la siguiente ecuación de valores propios expresada en forma matricial

$$\begin{bmatrix} d_1 & e_1 & 0 & \cdots & 0 & 0 \\ e_1 & d_2 & e_2 & \cdots & 0 & 0 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & d_{N-2} & e_{N-2} \\ 0 & 0 & 0 & \cdots & e_{N-2} & d_{N-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \phi_1 \\ \phi_2 \\ \phi_3 \\ \cdots \\ \phi_{N-2} \\ \phi_{N-1} \end{bmatrix} = \lambda \begin{bmatrix} \phi_1 \\ \phi_2 \\ \phi_3 \\ \cdots \\ \phi_{N-2} \\ \phi_{N-1} \end{bmatrix}, \quad (12)$$

siendo los elementos de la siguiente forma

$$d_k=\frac{2}{h^2}+V(r_k),\ e_k=-\frac{1}{h^2},\ k=1,\ \ldots,\ N-1. \quad (12)$$

Esto se ha implementado en Matlab/Octave, realizándose en primer lugar un test numérico para analizar la convergencia de los valores de las probabilidades de transición. El cálculo de estas probabilidades es aportación nuestra ya que no hemos encontrado datos con los que poder comparar.

Resultados

En la siguiente gráfica mostramos los resultados fundamentales de nuestro trabajo. Representamos las probabilidades de transición acumuladas desde el estado fundamental del átomo de hidrógeno confinado a los primeros estados ligados del átomo de hidrógeno libre que le son accesibles. Consideramos dos situaciones: una de mucho confinamiento (R_c=2 u.a.) y otra de poco confinamiento (R_c=4 u.a.). El primer punto de las gráficas representa la probabilidad de transición al estado 1s, el segundo punto es la suma de la probabilidad de que vaya al estado 1s y al 2s, y así sucesivamente.

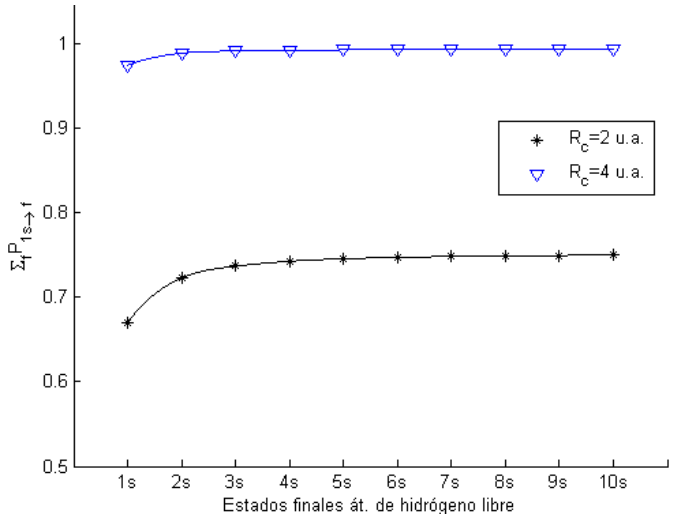


Figura 1. Representación de la probabilidad de transición acumulada frente a los posibles estados finales del átomo de hidrógeno libre.

Para R_c=4 u.a. vemos que la probabilidad se satura llegado un estado, por lo que es probable que, aun considerando más transiciones a otros posibles estados del espectro discreto, no llegue a valer 1, que es el valor al que tiene que tender la suma de las probabilidades de transición a todos los estados posibles. Esto sería indicativo de que se producen transiciones a estados del espectro continuo del átomo de hidrógeno libre. Para R_c=2 u.a. vemos que se satura sobre 0.75, por lo que es prácticamente seguro que hay transiciones al continuo. Físicamente, significa que hay cierta probabilidad de que el átomo de hidrógeno se ionice, en concreto, estimamos que en torno a un 25% para R_c=2 u.a. y por debajo del 1% para R_c=4 u.a. Esto es debido al solapamiento entre las funciones de onda de los estados.

Conclusiones

A raíz de nuestros resultados llegamos a las siguientes conclusiones:

- El fuerte confinamiento aquí analizado no es estable debido a que su probabilidad de ionización está en torno al 25%.
- Cuanto mayor es el solapamiento entre los estados inicial y final, mayor es la probabilidad de transición entre dichos estados.
- Futuros trabajos: incluir estados del espectro continuo, lo cual requiere un método específico al caso.

Bibliografía

[1] N. Zettilli, Quantum Mechanics: concepts and applications, Wiley, 2009, p. 303-308, 352-364, 583-584.

[2] B. H. Bransden, C. J. Joachain, Quantum Mechanics, Pearson Education Limited, 2000, p. 283-289, 351-367, 458-466.

[3] R. Guardiola, E. Higón, J. Ros, Mètodes numéries per a la física, Universitat de València, 2002, p. 254-259.

Capítulo 34. Mecanismos de nefrotoxicidad por bisfosfonatos. Efecto de la inhibición de la actividad farnesil difosfato sintasa por ácido zoledrónico sobre el sistema de la ubiquinona en células renales

Rosa María Nevado García, Lucía Fernández del Río y José Manuel Villalba Montoro

Universidad de Córdoba. Facultad Ciencias. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.

Campus Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 3ª planta, 14014-Córdoba. E-mail: rosanevadogarcia@gmail.com

Resumen

El ácido zoledrónico (ZOL) es un compuesto bisfosfonato con nitrógeno, cuya acción principal se relaciona con la inhibición de la farnesil difosfato sintasa, enzima fundamental en la ruta del mevalonato. El deterioro de la función renal supone una complicación patente en tratamientos con estos fármacos. Ya que las células de los túbulos renales son particularmente sensibles a la reducción de los niveles de coenzima Q, la nefrotoxicidad causada por bisfosfonatos podría estar relacionada con alteraciones en sistemas mitocondriales dependientes de coenzima Q. Nuestros resultados han confirmado que el ácido zoledrónico provoca un descenso del colesterol, aunque las concentraciones empleadas no fueron suficientes para apreciar un descenso significativo en la prenilación de GTPasas pequeñas y la activación de Erk1/2. Además, de manera llamativa, se observó un descenso significativo de la biosíntesis del coenzima Q, acorde con una bajada en la isoforma coenzima Q_9. De forma paralela, hemos observado en estas condiciones un gran incremento de los niveles de coenzima Q_{10}, invirtiendo incluso la ratio coenzima Q_{10}/Q_9 en células murinas. Nuestros resultados nos permiten postular nuevas ideas que nos acercan hacia un mayor entendimiento de los mecanismos de regulación de la síntesis de las diferentes isoformas del coenzima Q.

Fundamento

El ácido zoledrónico (ZOL) como inhibidor de la farnesil difosfato sintasa (FDPS), enzima clave en la ruta central del mevalonato, es ampliamente conocido por su capacidad de alterar la prenilación de proteínas GTPasas requeridas para procesos de señalización intracelular [1], hecho que se relaciona con su actividad farmacológica en el tratamiento de ciertas enfermedades óseas y algunos tipos de cánceres. También se ha puesto de manifiesto que la biosíntesis del colesterol, otra vía que se ramifica de la ruta del mevalonato, puede verse igualmente afectada [2]. Sin embargo, aún no ha sido evaluada la posibilidad de que los bisfosfonatos puedan interferir de manera significativa en la ruta de biosíntesis del coenzima Q (CoQ). Dicha razón supuso una primera motivación para que esta ruta metabólica se convirtiera finalmente en objeto del presente estudio. Concretamente, nuestra hipótesis experimental plantea que la nefrotoxicidad asociada al ZOL se fundamenta, al menos parcialmente, en una posible disminución en los niveles CoQ, de tal manera este daño renal podría verse asociado con alteraciones mitocondriales relacionadas con un déficit de ubiquinona.

Metodología

El modelo experimental elegido para este estudio fue una línea celular de ratón procedente de células del túbulo contorneado proximal de riñón (TKPTS), las cuales presentan CoQ_9 como isoforma mayoritaria y CoQ_{10} como minoritaria, proporción propia de las células murinas. En dichas células se evaluó la citotoxicidad inducida por el ZOL mediante dos métodos independientes pero complementarios, ensayo MTT y recuento celular. Se determinó el contenido lipídico celular de colesterol y CoQ (en sus dos isoformas, CoQ_9 y CoQ_{10}), mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La biosíntesis de CoQ se midió a partir de la incorporación del precursor *para*-hidroxibenzoato, marcado con ^{14}C. Por último, se cuantificaron los niveles de proteínas para Erk1/2 y Rab5A, empleando técnicas de detección mediante inmunoensayo por Western Blot.

Resultados y discusión

Previo al estudio de la acción que ejerce el ZOL en el sistema del CoQ en células TKPTS, se llevó a cabo una determinación de la viabilidad celular por medio de un ensayo MTT con el fin de analizar la citotoxicidad *in vitro* de este compuesto. En este ensayo se evaluó un intervalo relativamente amplio de concentraciones (desde 0 hasta 200 μM). A partir de los resultados obtenidos se determinaron las concentraciones más adecuadas para los tratamientos con ZOL, 5 y 20 μM, junto con el respectivo control sin tratamiento.

Para poder demostrar si el ZOL afecta a la ruta de biosíntesis del CoQ, se consideró adecuado evaluar previamente otras ramificaciones de la ruta del mevalonato, previamente descritas en la bibliografía. El estudio de la biosíntesis de colesterol, así como el proceso de prenilación de proteínas nos servirán como controles positivos para asegurarnos que el ZOL está actuando en las células inhibiendo la enzima FDPS.

La cuantificación de niveles de colesterol se realizó mediante HPLC acoplado a detección con ultravioleta y quedó patente que el ZOL es capaz de disminuir la producción de colesterol y que, por consiguiente, está ejerciendo su función inhibitoria en el modelo experimental, tal y como ha sido previamente descrito en la bibliografía [2].

Para el estudio de la prenilación de proteínas se emplearon técnicas de inmunoensayo por Western Blot. Se realizó un estudio preliminar de la prenilación de proteínas de manera directa, cuantificando los niveles de la GTPasa pequeña Rab5A en fracción membranosa y

citosólica, en los cuales no se pudieron extraer resultados concluyentes debido a limitaciones experimentales. Asimismo, se estudiaron los efectos del ZOL sobre la prenilación de proteínas mediante un abordaje indirecto, cuantificando la presencia de la MAPK Erk1/2 fosforilada, modificación activada por Ras. En este caso, y en contrapartida con los resultados tan claros para el análisis del colesterol, los obtenidos para el proceso de prenilación de proteínas no lo fueron tanto. La disminución del grado de fosforilación de Erk1/2 no resultó significativa, pero sí que podemos hablar de tendencias en el sentido esperado.

Atendiendo ahora a los resultados relativos al estudio de la biosíntesis del CoQ por medio de la incorporación de PHB radiactivo, se comprobó una disminución significativa en cuanto a la producción de este compuesto (Figura 1.A). Este descenso en la biosíntesis de CoQ puede justificar la bajada tan pronunciada de los niveles totales de CoQ_9 (Figura 1.B). Por el contrario, al analizar los niveles totales de CoQ_{10} (Figura 1.C), las conclusiones que podemos extraer son realmente sorprendentes, puesto que obtuvimos el resultado contrario. Esta isoforma de CoQ aumenta significativamente y en una proporción relativamente alta conforme elevamos la concentración de ZOL. Sin embargo, la cantidad de CoQ_{10} que aumenta no compensa la bajada tan abrupta de CoQ_9 y, por tanto, en términos generales (sin distinguir entre las dos isoformas) podemos hablar de una disminución de los niveles de CoQ total (Figura 1.D). Además, cabe mencionar que en presencia de ZOL la cantidad de CoQ_{10} aumenta tanto, a altas concentraciones, que llega a ser casi dos veces superior a la cantidad de la isoforma de CoQ_9, invirtiéndose la ratio CoQ_{10}/CoQ_9 (Figura 1.E), lo cual nunca ha sido observado en células o tejidos de origen murino bajo ninguna condición experimental.

De acuerdo con nuestros resultados, la bajada en los niveles de CoQ total que provoca el ZOL en el sistema celular en estudio, podría ser una explicación plausible, al menos parcial, para comprender los efectos nefrotóxicos que genera este tipo de compuesto.

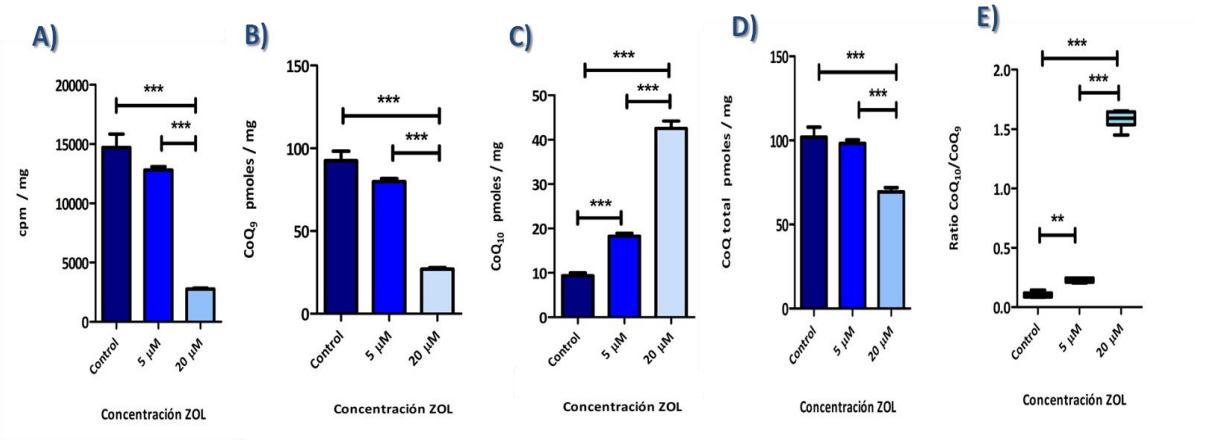


Figura 1. Efectos del ZOL sobre el sistema de la ubiquinona en células TKPTS. A) Biosíntesis de coenzima Q. B) Niveles de CoQ_9. C) Niveles de CoQ_{10}. D) Niveles de CoQ totales. E) Ratio CoQ_{10}/CoQ_9.

Una vez que hemos esclarecido los aspectos fundamentales que nos planteábamos como objetivo principal, es oportuno comentar, que los experimentos realizados han permitido obtener conclusiones que van más allá de nuestra hipótesis de partida. Estas ideas se encaminan hacia nuevas interpretaciones sobre los mecanismos de regulación de las diferentes isoformas de CoQ en las células murinas.

Estos resultados permiten plantearnos que la regulación de la biosíntesis para las distintas colas isoprenoides del CoQ es diferente y que, por tanto, la síntesis de una cola de nueve o diez isoprenos (que en última instancia dará lugar a CoQ_9 o CoQ_{10}, respectivamente) dependerá del equilibrio de metabolitos de la ruta del mevalonato que presente la célula en cada momento. De manera natural la FDPS se encuentra activa y es capaz de catalizar la transformación completa de una molécula de IPP y otra de DMAPP hasta GPP y seguidamente condensar otro IPP para generar el producto final de la reacción, FPP [3], el cual se utilizará como precursor metabólico para los distintos productos de la ruta, incluyendo la cola isoprenoide del CoQ. Hasta hace poco tiempo se asumía que en mamíferos la existencia de GPP en la célula se limitaba a un intermediario transitorio de la reacción que cataliza la FDPS. Sin embargo, se plantea que el GPP pueda ser el responsable, de alguna manera, del aumento espectacular en los niveles de CoQ_{10} coincidente con el descenso de los de CoQ_9 bajo condiciones de tratamiento con altas concentraciones de ZOL.

Así, planteamos la hipótesis según la cual la síntesis de las diferentes isoformas de CoQ varía en función de la cantidad de metabolitos precursores disponibles en la célula. En condiciones basales el FPP es el metabolito mayoritario mientras que en presencia de ZOL, los metabolitos predominantes serían GPP e IPP. De tal modo, y en vista de los resultados obtenidos, podríamos plantearnos que en presencia de altos niveles de FPP se favorezca la síntesis de CoQ_9 (equivalente a la situación control en nuestro modelo experimental), mientras que en presencia de altas concentraciones de GPP + IPP (inducidas por la acción del ZOL) se promueva la síntesis de CoQ_{10}. Esta hipótesis se apoya además en el hecho de que la *trans*-prenil transferasa en mamíferos prefiere como sustrato al GPP frente al FPP en ensayos *in vitro*, como ya ha sido previamente descrito para fracciones microsomales [4]. Estos resultados abren las puertas a futuras investigaciones que puedan reforzar y ampliar los hallazgos hasta ahora descritos.

Conclusiones

- El ZOL es capaz de alterar diferentes ramificaciones de la ruta del mevalonato. La biosíntesis del colesterol se ve seriamente disminuida en presencia de este compuesto. Pera la prenilación de proteínas sus efectos inhibitorios en células TKPTS no son tan acusados.

- Respecto al CoQ, destacar que su biosíntesis se ve inhibida significativamente a nivel global. Este hecho se refleja en una bajada de los niveles totales de CoQ, lo que podría suponer una explicación plausible a los efectos nefrotóxicos del ZOL, ya que las células renales son especialmente sensibles a una disminución en este compuesto.

- La FDPS podría jugar un papel clave en la regulación de la biosíntesis del CoQ. De tal modo, proponemos la existencia de una afinidad diferencial entre posibles sustratos para la *trans*-prenil transferasa, enzima que sintetiza la cola isoprenoide del CoQ. La acción del ZOL podría inducir un aumento de la cantidad de GPP + IPP, situación que favorecería la síntesis de una cola de 10 isoprenos frente a una de 9 unidades.

Bibliografía

[1] H. Karlic, R. Thaler, C. Gerner, T. Grunt, K. Proestling, F. Haider, and F. Varga, Cancer Genet., vol. 208, no. 5, pp. 241–252, 2015.

[2] M. Goffinet, M. Thoulouzan, A. Pradines, I. Lajoie-Mazenc, C. Weinbaum, J. C. Faye, and S. Séronie-Vivien, BMC Cancer, vol. 6, p. 60, 2006.

[3] M. K. Tsoumpra, J. R. Muniz, B. L. Barnett, A. A. Kwaasi, E. S. Pilka, K. L. Kavanagh, A. Evdokimov, R. L. Walter, F. Von Delft, F. H. Ebetino, U. Oppermann, R. G. G. Russell, and J. E. Dunford, Bone, vol. 81, pp. 478–486, 2015.

[4] G. Dallner and P. J. Sindelar, Free Radic. Biol. Med., vol. 29, no. 0, pp. 231–240, 2000.

Capítulo 35. Construcción de mutantes en el gen ck2 en Fusarium oxysporum

Juan Carlos Núñez, M. Isabel González, Concepción de la Hera

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Genetica.

Campus de Rabanales, Edif. Gregor Mendel, 1ª planta. E-mail: b32nuroj@uco.es

Resumen

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* es una especie patógena de hongos que afecta a plantas de tomate. El proceso de infección es complejo y está altamente regulado. Recientemente se ha demostrado la participación del sistema SCF-fbp1 de degradación por proteosoma en la regulación de la ruta MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), encargada de la infección y la virulencia del hongo.

Las caseínas quinasas de la Familia I pueden fosforilar los sustratos del sistema SCF-fbp1. En *F. oxysporum* existen dos genes que codifican para caseínas quinasas: El gen FOXG_05428 (*ck1*), del cual se ha demostrado que es importante para la virulencia del hongo, y el gen FOXG_03065 (*ck2*) sujeto de este trabajo.

El objetivo de este trabajo es la creación de mutantes knock-out, que después podrán ser utilizados para determinar el papel de la proteína Ck2 y saber si está implicada en el proceso de infección. Para esto se construyó un alelo mutante del gen sustituyendo la caseína quinasa por un gen de resistencia a antibióticos. Con este alelo se transformaron protoplastos silvestres del hongo. Tras seleccionar los transformantes se analizaron molecularmente para determinar si se había producido correctamente la recombinación homóloga y el gen había sido interrumpido.

Fundamento

Fusarium es un género de hongos perteneciente a la familia Nectriaceae, dentro del cual se encuentra la especie patógena *Fusarium oxysporum*. Este hongo es capaz de infectar más de 120 cultivos diferentes e incluso a mamíferos inmunodeprimidos; por ello es de gran importancia su estudio y el esclarecimiento de los mecanismos de infección. En concreto trabajaremos con *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* responsable de la infección de la planta del tomate.

Existen varios mecanismos por los cuales el hongo es capaz de detectar la presencia de la planta, incluso sin llegar a estar en contacto con ella, para penetrar e invadir el tejido vegetal. Uno de los que han sido identificados es la ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) [1] en la cual se enmarca este trabajo. Esta ruta es constituida por tres quinasas: MAPKKK, MAPKK, MAPK. Se ha demostrado la participación del sistema SCF-fbp1 de degradación por proteosoma en la regulación de esta ruta, afectando al crecimiento y virulencia de *F. oxysporum* [2]. En algunos casos para que este proceso pueda suceder el sustrato ha tenido que ser fosforilado previamente por una caseína quinasa de la familia I [3].

Se han identificado dos genes que codifican proteínas de esta familia: FOXG_05428 (*ck1*) y FOXG_03065 (*ck2*). Previamente se ha demostrado la importancia de Ck1 en el desarrollo y virulencia de *F.oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Para saber si la proteína Ck2 también está implicada en este proceso, se intentará obtener un mutante knock-out de este gen utilizando la técnica de *Split-Marker* [4]. Finalmente se analizarán molecularmente los transformantes para comprobar si ha sido posible interrumpir el gen correctamente.

Metodología

Transformación de protoplastos silvestres: Previamente se prepararon los siguientes soluciones y medios de cultivo: STC, TEC, PEG y Medio Mínimo de regeneración repartido en placas de agar y top agar. A 2 µg de ADN transformante le fue añadido ATA y TEC (Paralelamente realizamos el mismo proceso sin ADN transformante para hacer el control). A continuación esta solución se mezcló con los protoplastos, se incubó en frio 20 min, se añadió PEG y se incubó 15 min a RT. Posteriormente se añadió después STC, se centrifugó 5 min quedándonos con el pellet y se resuspendió en STC. A partir del tubo control realizamos diluciones seriadas para hacer las placas de Control del antibiótico higromicina, Controles de Regeneración y Control de esporas. Por último se realizó una siembra en top agar sobre las placas de medio mínimo. Pasadas 14 horas añadimos a las placas transformantes y al Control de antibiótico un agar de cobertera con Higromicina.

Extracción de ADN genómico: La extracción se realizó a partir del micelio del hongo congelado, este se introdujo en un eppendorf de 2µl junto a las bolas de cristal que trituraron el micelio. A continuación en una campana de extracción de gases se añadió CTAB, β-mercaptoetanol y cloroformo:octanol (24:1) dando un vortex al echar cada producto. Se dejaron incubar los eppendorf primero 30 min a 65ºC y luego 15 min a RT. Una vez incubado se centrifugó 5 min quedándonos con el sobrenadante, se le añadió a este 1 mL de etanol frio y se incubó a -20ºC. Por último se realizaron lavados con etanol (70%) obteniéndose un pellet que fue secado en el speed-vac y resuspendido en 50-100 µL de agua.

Análisis Southern: Previamente se seleccionó la enzima de restricción correcta para realizar las digestiones del ADN y las pusimos junto a su buffer 2 h a 37ºC. Una vez comprobado que las digestiones se han realizado correctamente, cargamos el ADN digerido en un gel de Agarosa al 0.7%.

Primero se realizó un tratamiento al gel con tres fases: Hidrólisis Acida, Desnaturalización y Neutralización. Una vez finalizados se procedió a montar el blot, que consiste en el montaje de un sistema por el cual el ADN del gel queda retenido en una membrana de nylon. El blot se deja toda la noche. Una vez desmontado el blot pusimos la membrana a 80ºC para que el ADN quede fijado. Después de una hora introducimos la membrana en una botella donde se le añadió la solución de prehibridación (30 min 50ºC). A continuación se reemplazo la solución por la sonda marcada con digoxigenina y previamente desnaturalizada (Toda la noche 50ºC). Antes de realizar el revelado se hicieron los lavados recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Soluciones y lavados del Southern.

1. 5 min 2xSSC:0.1% SDS (x2	4. 30 min con AC en Buffer 2
2. 15 min con 0.5xSSC:0.1SDS a 50ºC (x2)	5. 15 min con Buffer 1:0.3% Tween 20 (2x)
3. 30 min con Buffer 2	6. 5 min con Buffer 3 sin Mg

Resultados

Se diseñaron los oligos que se muestran en la figura 1. Siguiendo el protocolo descrito por Catlett et al. (2003) en tres rondas de PCR obtuvimos dos fragmentos de ADN solapante [Figura 2] a partir de ADN genómico y el gen marcador de Higromicina, obtenido por PCR a partir de un vector.

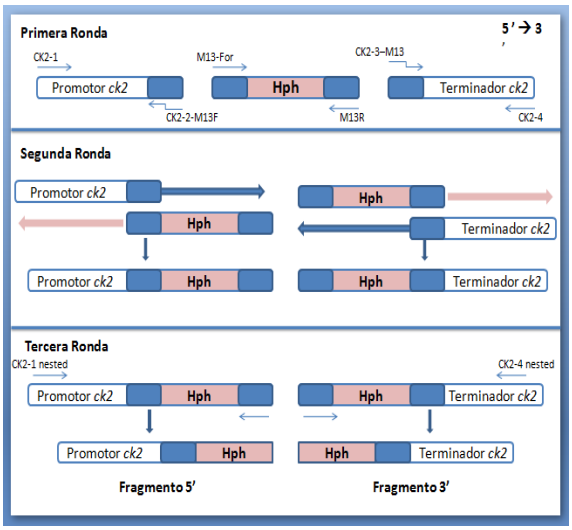


Figura 1. Esquema de la construcción de fragmentos por PCR, para transformación por el método Split Marker

Realizamos varias transformaciones de las que obtuvimos un total de **88 transformantes** resistentes al antibiótico higromicina. Estos transformantes fueron sembrados en diferentes

placas master de PDA con higromicina. Después se realizó un "single sporing" primario y secundario para traspasar finalmente los transformantes a PDB con higromicina. Una vez crecidos en condiciones óptimas se recogió el micelio y las esporas quedando guardados a -80ºC.

Una vez extraído el ADN realizamos PCRs con oligos presentes en la ORF para ver si el gen había sido interrumpido correctamente. En todos los casos analizados fue amplificado la secuencia del gen ck2, lo que nos indica que en principio ninguno de los transformantes era recombinante homologo.

En segundo lugar se realizó PCR`s con oligos en 5' y 3' del gen y oligos del casette higromicina. En los casos de los transformantes 32, 58 y 60 se amplificó un fragmento del tamaño correcto en el extremo 3' como vemos en la figura 3.

Por último hicimos un análisis southern con una sonda en 5'para confirmar que el gen no había sido interrumpido de manera correcta, con lo cual seguía conservando su función original.

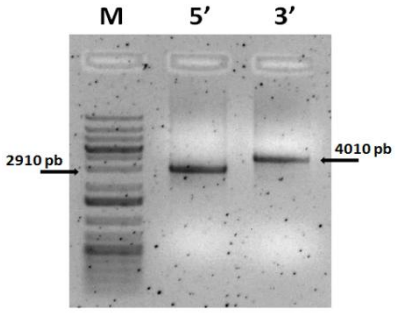


Figura 2. PCR de amplificación de fragmentos 5' y 3' en un gel de agarosa al 0.7%

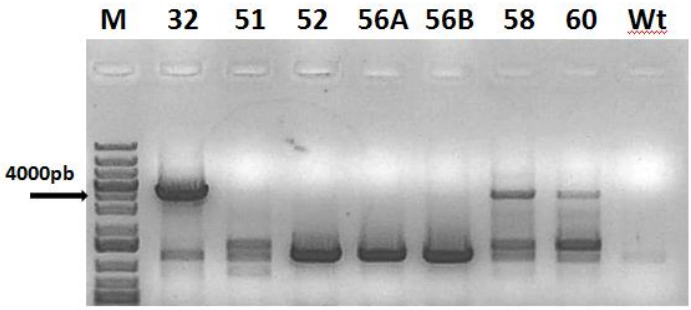


Figura 3. Resultado PCR del extremo 3' en un gel de agarosa al 0.7%

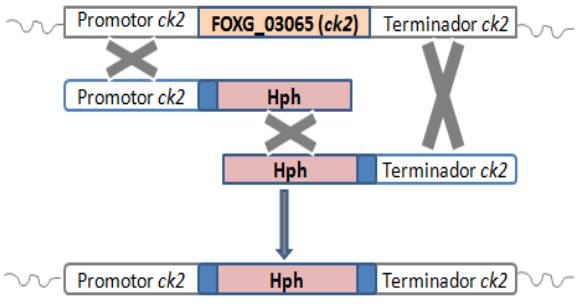


Figura 4. Representación esquemática de la interrupción génica por Split Marker

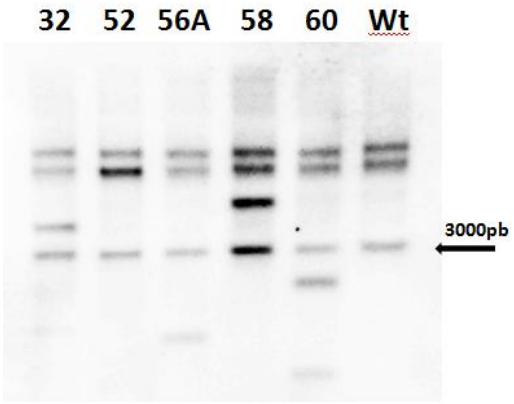


Figura 5. Análisis Southern con sonda en el extremo 5'.

Co

- De los 88 transformantes analizados en este trabajo ninguno resultó ser recombinante homologo lo que sugiere que ck2 pudiera ser **un gen esencial** para Fusarium oxysporum. Previamente ya se había intentado interrumpir este gen y tampoco fue posible.

- Para comprobar si esta hipótesis es correcta habría que hacer un mutante con un promotor regulable que permitiera encender y apagar el gen para comprobar si es esencial o no y poder determinar su papel.

Bibliografia

[1] Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Méglecz, E. and Roncero, M. I. G. (2001), A MAP kinase of the vascular wilt fungus Fusarium oxysporum is essential for root penetration and pathogenesis. Mol. Microbiol., 39: 1140–1152.

[2] Miguel-Rojas, C. and Hera, C. (2013). Proteomic identification of potential target proteins regulated by the SCF F bp1 -mediated proteolysis pathway in Fusarium oxysporum. Mol. Plant Pathol., 14(9): 934-945.

[3] Knippschild, U. et al. (2005). The casein kinase I family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes. Cell. Signal. 17: 675-689

[4] Catlett NL, Lee BN, Poder OC, Turgeon G (2003) Split-Marker Recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. Fungal Genenet. Newsletter 50: 3.

Capítulo 36. Efecto de una dieta funcional enriquecida con probióticos y extracto de dátil sobre la expresión proteica de la dorada (Sparus aurata)

Ana Belén Plata Gómez

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Edificio Severo Ochoa. Campus de Rabanales. 14071. Córdoba. E-mail: anabelenplata@hotmail.com

Resumen

La acuicultura intensiva es una actividad productiva cuyo desarrollo está condicionado por diversas patologías infecciosas. Esto ha cobrado mayor relevancia debido a la prohibición en la Unión Europea de muchos de los fármacos veterinarios clásicos, lo que exige la búsqueda de alternativas naturales efectivas y seguras. En este sentido, los probióticos y extractos vegetales pueden desempeñar un importante papel. En el presente trabajo se ha investigado el efecto a nivel proteómico de una dieta suplementada con los probióticos *Shewanella putrefaciens* Pdp11 y *Bacillus sp.* en combinación con un extracto de dátil sobre especímenes de dorada (*Sparus aurata*) cultivados en condiciones normales, así como en presencia de una infección experimental por *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*. El análisis de la expresión proteica diferencial mediante 2-DE ha puesto de manifiesto cambios de expresión significativos en 19 proteínas. Un análisis preliminar de las proteínas diferencialmente expresadas ha permitido identificar, entre otras, varias actinas, conocidos sensores redox fisiológicos, lo que podría relacionarse con el estrés oxidativo inducido por la infección y/o con el papel antioxidante atribuido a la dieta funcional. En esta línea, se ha analizado la oxidación reversible de los tioles proteicos así como la actividad de enzimas relacionadas con el estado redox celular y las defensas antioxidantes.

Fundamento

La acuicultura es una actividad que muestra una gran proyección de futuro y, de hecho, se encuentra entre los sectores de producción de alimentos con un mayor crecimiento a nivel mundial en la actualidad. Sin embargo, diversas infecciones causadas por patógenos bacterianos y virales condicionan el desarrollo del sector, lo que conduce, además, a importantes pérdidas económicas [1]. En este sentido, la administración de aditivos en la dieta representa una opción prometedora para estimular los mecanismos naturales de defensa de los animales, y son útiles para la prevención y tratamiento de las patologías de los peces en cultivo. En las dietas salud destacan los ingredientes nutracéuticos, y entre ellos los extractos vegetales, así como la manipulación del microbioma. En concreto, el presente trabajo se centra en la dorada (*Sparus aurata*), por su gran relevancia económica para la acuicultura al tratarse de la especie marina más producida en España y la segunda a nivel mundial. Centrándonos en los **probióticos**, se definen como microorganismos vivos que, generalmente, se suministran como suplemento en la dieta beneficiando la salud del hospedador. En los últimos años múltiples estudios han determinado que proporcionan una mejora del estado general del sistema inmune, una mayor resistencia frente a patógenos, y un crecimiento más eficiente de los peces [2]. En acuicultura la que se encuentra mejor documentada es la bacteria ácido-láctica *Bacillus sp.*; la otra bacteria probiótica empleada en este estudio es *Shewanella putrefaciens* Pdp11. Por otra parte, dentro de los alimentos funcionales, los **productos de origen vegetal** se seleccionaron por su riqueza en sustancias bioactivas y se han considerado como un sustituto sostenible y eficiente de los tratamientos químicos. En el caso del dátil, estudios recientes han demostrado sus propiedades beneficiosas sobre la salud. Ello convierte a estos aditivos alimenticios en excelentes candidatos como agentes profilácticos contra el estrés producido por enfermedades infecciosas así como por la propia manipulación.

Metodología

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron enviadas por el grupo de la Dra. Esteban de la Universidad de Murcia. Se establecieron un total de cuatro condiciones experimentales en acuarios marinos independientes, cada una de las cuales estaba formada por diez individuos. A las doradas se les suministraron los probióticos vivos y el extracto de dátil incorporados en el pienso durante 4 semanas. Como control se emplearon individuos alimentados con el pienso estándar sin aditivos. Transcurridas las 4 semanas se recogieron 10 individuos de cada régimen de alimentación (grupos control y PBD). En ese momento se indujo una infección con *P. damselae* subs. *piscicida* mediante inyección intraperitoneal, continuando con las mismas dietas otras dos semanas más, al cabo de las cuales se recogieron otros 10 especímenes de cada grupo, que denominaremos INF y PBD-INF. Posteriormente los animales fueron sacrificados y se extrajeron el riñón cefálico y el hígado que se congelaron en nitrógeno líquido y se enviaron a la Universidad de Córdoba. Ya en nuestro laboratorio los órganos se trituraron de forma individual y se procedió a obtener los extractos de proteínas.

En primer lugar, la extracción de proteínas se realizó partiendo de 100 mg de tejido triturado, y se verificó la ausencia de degradación mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Posteriormente se determinó la concentración de proteína mediante el método de Bradford. Por una parte, se realizaron experimentos de **electroforesis bidimensional** con las muestras correspondientes a riñón cefálico. Tras teñir los geles y obtener las imágenes digitales, se procedió a realizar el análisis cuantitativo de proteínas, en el que se obtuvo un promedio de 1000 *spots* por gel, y posteriormente se seleccionaron aquellos que mostraban cambios estadísticamente significativos. Las proteínas diferencialmente expresadas se analizaron mediante espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica de la UCO; tras la

digestión con tripsina los péptidos obtenidos fueron analizados mediante huella peptídica y espectrometría de masas en tándem (2-DE-PMF-MS/MS). Por otra parte, se llevó a cabo el **análisis del estado redox** de los tioles de las proteínas en hígado de dorada, bloqueando los tioles reducidos en el momento de la extracción proteica y reduciéndolos y marcándolos con posterioridad. Por último, todas las **actividades enzimáticas** se determinaron en extractos proteicos obtenidos a partir de riñón cefálico.

Resultados

En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio de los perfiles de expresión proteica en riñón cefálico de *S. aurata*, y en base a los criterios establecidos, se encontraron un total de 19 spots con expresión alterada de forma significativa (Fig 1). Considerando los cambios en su conjunto (Fig 2), se observa que algunas de dichas variaciones de expresión son atribuibles a la dieta funcional administrada a los especímenes, es decir, debido al efecto de los probióticos *S. putrefaciens* Pdp11 y *Bacillus sp.* con el extracto de dátil, mientras que otros están provocados por la infección por el patógeno *P. damselae subsp. piscicida*.

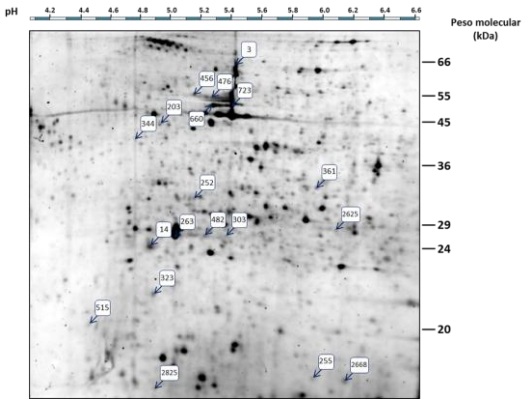


Fig 1. Posición de los cambios detectados en el proteoma de riñón cefálico de S. aurata.

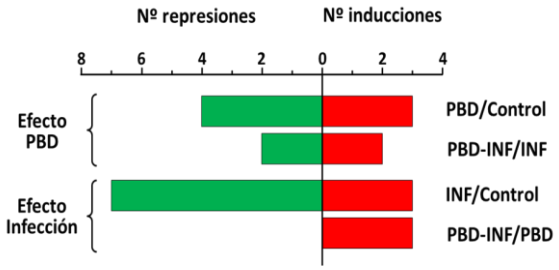


Fig 2. Resumen de los cambios observados en los niveles de expresión proteica. Se indica el número de proteínas cuya expresión ha sido reprimida o inducida en las diferentes condiciones experimentales respecto a un grupo de referencia.

Los cambios más destacados son consecuencia de la **dieta funcional**, atribuidos, según investigaciones previas, a incrementos en la actividad de las enzimas digestivas del pez, tales como amilasas o proteasas, lo que le permitiría degradar de forma más activa los nutrientes, así como una mayor actividad de proteínas relacionadas con el sistema inmune, tales como la fagocitosis o la producción de moco, proporcionando una mayor resistencia a infecciones. En cuanto al efecto de la **infección**, las inducciones observadas pueden deberse a que dicho estado patológico promueva una mayor expresión de proteínas relacionadas con la defensa inmune o la respuesta al estrés. Sin embargo, el patógeno también puede provocar alteraciones a nivel del metabolismo o la estructura celular, o incluso la homeostasis de iones. La siguiente etapa en el presente trabajo ha sido la identificación de dichas proteínas diferencialmente expresadas a causa de la dieta y la infección mediante PMF-MS/MS.

Centrándonos en los *spots* identificados, cabe destacar que cuatro de ellos corresponden a isoformas de β-actina, considerada como una proteína estructural y que, además, presenta una función importante a nivel de señalización. Investigaciones previas han permitido determinar

que tres de los seis residuos de cisteína conservados en esta proteína constituyen residuos redox activos, de tal modo que presentan una importante función en la regulación de diversos procesos celulares mediante oxidación reversible. Consecuentemente, las diferencias de expresión de las β-actinas que se han observado tras los análisis llevados a cabo, podrían relacionarse con cambios del estado redox inducidos por la infección y/o con el papel antioxidante atribuido a la dieta funcional [3].

Al realizar la comparación del grado de oxidación reversible de los grupos tioles proteicos entre las diferentes condiciones experimentales los resultados (Fig 3A), permiten comprobar que no se han encontrado cambios cuantitativos significativos globales. Sin embargo, los patrones de bandas de la SDS-PAGE demuestran que existe oxidación diferencial en proteínas específicas de dichas muestras (Fig 3B).

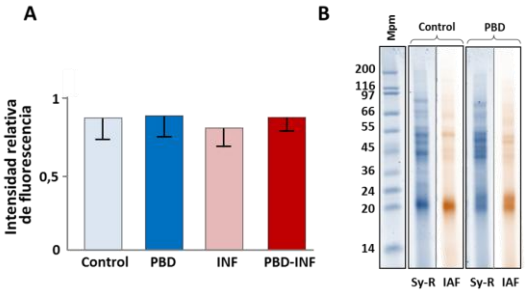


Fig. 3. SDS-Page de proteínas con grupos tioles oxidados de forma reversible

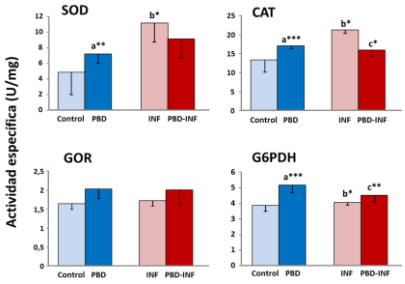


Fig 4. Actividades enzimáticas relacionadas con la respuesta antioxidante.

Por otra parte, se decidió investigar si la actividad de cuatro enzimas fundamentales en la respuesta antioxidante (SOD, CAT, GOR y G6PDH), se alteraba en las diversas condiciones experimentales de este estudio, en base a su papel como línea de defensa frente al estrés oxidativo (Fig 4). Los resultados de este análisis ponen de manifiesto que los probióticos *S. putrefaciens* Pdp11 y *Bacillus sp.* en combinación con el extracto de dátil incrementan la actividad específica de enzimas antioxidantes, constituyendo una herramienta preventiva y protectora frente a los efectos de las EROs u otros agentes oxidantes.

Conclusiones

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren un efecto beneficioso en la dorada de la administración de las bacterias probióticas en combinación con el extracto de dátil, asociado a una mejora de la homeostasis redox. Por tanto, esta dieta funcional constituye una herramienta prometedora como tratamiento profiláctico en situaciones que supongan una mayor susceptibilidad frente a patógenos, una de las principales causas de pérdidas económicas, para mejorar el bienestar de los animales durante su cultivo, y aumentar la productividad de manera sostenible.

Bibliografía

[1] APROMAR (2015) La acuicultura en España. Ministerio de agricultura, alimentación y medioambiente; Fondo europeo de pesca de la UE, Cádiz (España).

[2] Cerezuela, R. (2011) Current Knowledge in Synbiotic Use for Fish Aquaculture: A Review

[3] Guardiola, F.A., Porcino, C., Cerezuela, R., Cuesta, A., Faggio, C. and Esteban, M.A. (2016) Impact of date palm fruit extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (Dicentrarchus labrax). *Fish Shellfish Immunol*, 52, 298-308.

Capítulo 37. Biomarcadores moleculares de estrés oxidativo para evaluar contaminación ambiental

Rosa María Tarradas Valero, Carmen Michán Doña, José Alhama Carmona

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Campus de Rabanales, edificio Severo Ochoa 2ª planta, Córdoba. E-mail: rosa.tarradas.valero@gmail.com

Resumen

La contaminación es un fenómeno global de nuestro tiempo, que afecta tanto al medio natural como a los seres vivos. Por ello, son necesarios estudios medioambientales dirigidos a identificar respuestas biológicas frente a xenobióticos y contaminantes. La coquina de fango *Scrobicularia plana* es un organismo acuático de amplia presencia en el entorno de Parque Nacional de Doñana, nuestra zona de interés. La finalidad de este proyecto es el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes en *S. plana* con objeto de identificar respuestas específicas a determinados contaminantes que puedan ser utilizadas como indicadores tempranos de daño en el Medio Ambiente. Para ello, se analizaron las respuestas biológicas mediante biomarcadores moleculares, que reflejan las respuestas subletales a la exposición de los contaminantes. Se midieron enzimas antioxidativas tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (KAT), o glutatión transferasa (GST) y los niveles de malondialdehído (MDA) y glutatión a partir de la glándula digestiva de coquinas expuestas de forma controlada a distintas concentraciones de metales pesados (arsénico, As), como coquinas capturadas en los sedimentos del Estuario del Guadalquivir.

Los resultados obtenidos sugieren niveles más elevados de contaminación en la zona de Bonanza, situada al final del Estuario del Guadalquivir.

Fundamento

Tanto el medio natural como el urbano reciben el impacto de un número cada vez mayor de xenobióticos y sustancias contaminantes. Los estudios medioambientales dirigidos a identificar respuestas biológicas frente a contaminantes ambientales encuentran serias dificultades en su aplicación, ya que los ecosistemas son complejos, los contaminantes son diversos, y además pueden interaccionan entre sí. Para determinar con precisión esta respuesta, son necesarias tanto exposiciones controladas en laboratorio, como el análisis de muestras de campo obtenidas en sitios contaminados frente a muestras procedentes de sitios limpios. La coquina de fango *S. plana* es un organismo acuático de amplia presencia en el entorno de Parque Nacional de Doñana (Fig. 1), zona modelo ya que en un área relativamente pequeña se pueden localizar tanto zonas muy contaminadas como entornos protegidos con poca presencia de contaminantes. El objetivo de este proyecto es el estudio de los efectos biológicos de los contaminantes en *S. plana* mediante la utilización de una batería de herramientas bioquímicas.

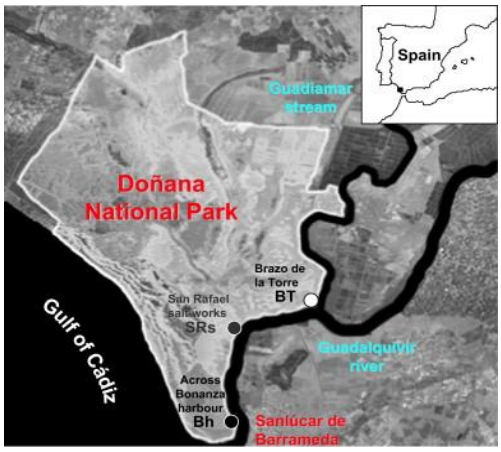


Figura 1. Mapa del Parque Nacional de Doñana. Se indican las localizaciones geográficas de Bonanza y Brazo de la Torre, donde fueron recogidas las muestras.

Metodología

El objetivo final del proyecto es la identificación de respuestas específicas a determinados contaminantes que puedan ser utilizadas como indicadores tempranos de daño en el Medio Ambiente. Para ello se utilizarán tanto coquinas expuestas de forma controlada a distintas concentraciones (0, 10 y 100 μM) de metales pesados como el arsénico (As), como coquinas capturadas en los sedimentos de las orillas del Parque frente al puerto de Bonanza (BON) y en la entrada del arroyo Brazo de la Torre (BDT). Las coquinas de fango fueron muestreadas manualmente, se practicó una limpieza externa, se aisló la glándula digestiva mediante disección y se congelaron en N_2. Finalmente, fueron almacenadas a -80ºC hasta su procesamiento. Se obtuvieron 15 réplicas biológicas para cada zona, las cuales, debido a su pequeño tamaño, se unieron en tres grupos de 5 individuos cada uno (BON y BDT 1, 6 y 11) con objeto de tener tres réplicas biológicas de mayor volumen para cada ensayo.

Los biomarcadores, además de proporcionar una medida indirecta de la fracción biodisponible de los contaminantes en agua y sedimentos, reflejan las respuestas subletales a la exposición de los mismos. En las coquinas se midieron espectrofotométricamente enzimas antioxidativas (SOD, KAT, GST), niveles de MDA (daños oxidativos a lípidos) y los niveles/estado redox del glutatión, siguiendo protocolos previamente establecidos en nuestro grupo [1, 2]. El objetivo de la determinación de los niveles de MDA presentes en las muestras no es otro que el de realizar una medida indirecta de la peroxidación lipídica, ya que el este compuesto es un producto de la descomposición de los lipohidroperóxidos.

Resultados y Conclusiones

De manera general, las muestras tomadas en Bonanza (BON) presentan una mayor actividad en todas las enzimas antioxidativas medidas, así como en los niveles de MDA y Glutatión total (Fig. 2-3 y datos no mostrados).

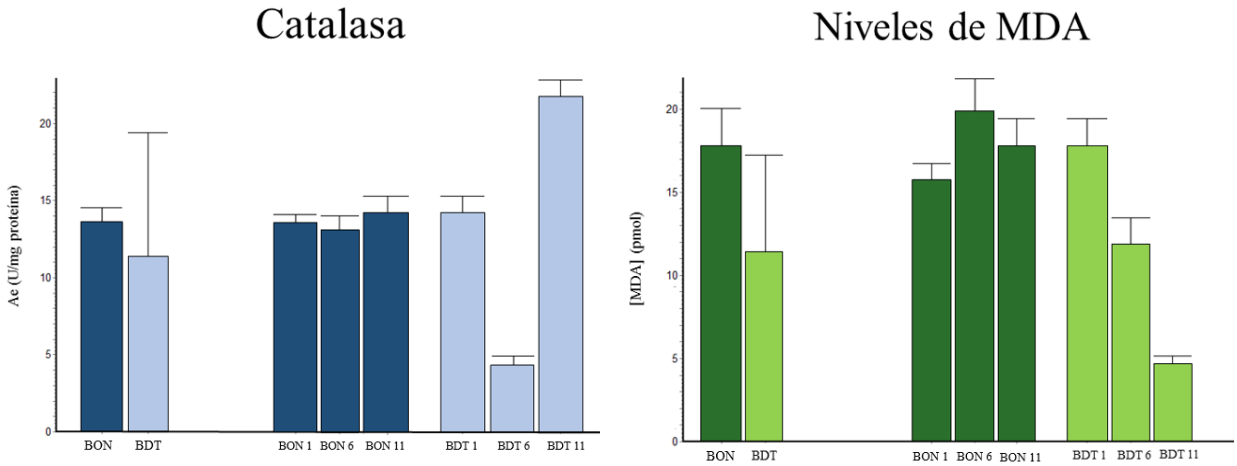


Figura 2. Actividad catalasa y niveles de MDA presentes en las muestras (BON y BDT) y en sus réplicas biológicas (1, 6 y 11). Se muestran los resultados de las réplicas biológicas (derecha), y su media correspondiente (izquierda).

Del mismo modo, en la determinación de actividad SOD (Fig. 3) se aprecia mayor mayor actividad en las muestras de BON que en las de BDT.

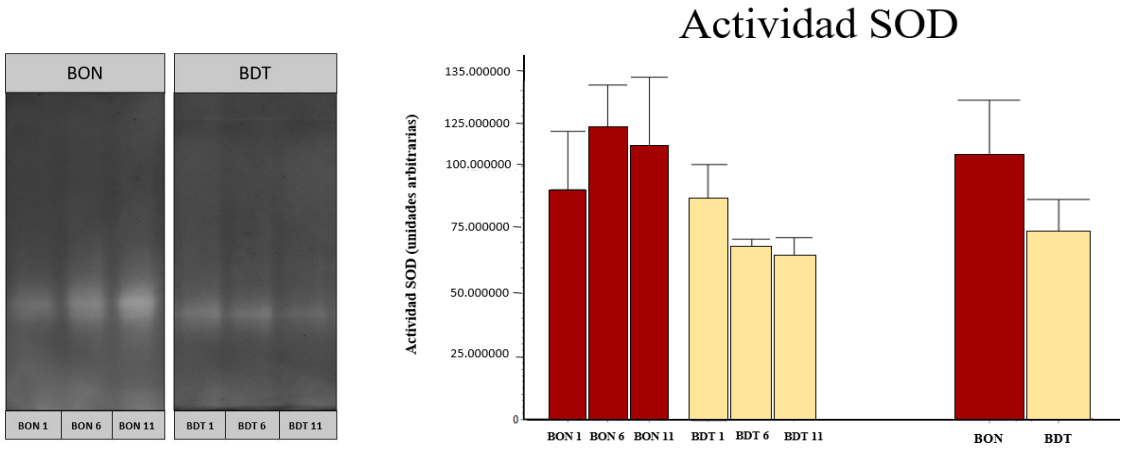


Figura 3. Gel de electroforesis (PAGE) y actividad superóxido dismutasa. En la gráfica se ha representado la intensidad total (actividad SOD) obtenida en geles separados por electroforesis nativa. Se muestran los resultados de las réplicas biológicas (izquierda), y su media correspondiente (derecha).

Los valores resultantes de las medidas de de las actividades enzimáticas, así como de los niveles de MDA y glutatión, varían tanto entre los pooles de las réplicas biológicas como entre ambas localizaciones geográficas, pero los valores medios son más altos en Bonanza que en Brazo de la Torre (Fig 2-3 y datos no mostrados), lo cual indicaría una mayor

inducción de estrés oxidativo en la primera zona. Estos resultados sugieren, por tanto, niveles más elevados de contaminación en la zona de Bonanza, situada al final del Estuario del Guadalquivir. También puede apreciarse en las gráficas, que a mayor contaminación (como es el caso de BON), menor variabilidad entre las réplicas biológicas.

Con respecto a las muestras expuestas de forma controlada a distintas concentraciones de As, se observa que tras un día de exposición aumentan las actividades enzimáticas medidas con concentraciones crecientes de arsénico, mientras que tras 7 días de exposición al metal, la tendencia general es a disminuir la actividad enzimática con el aumento de concentración del mismo (Fig. 4).

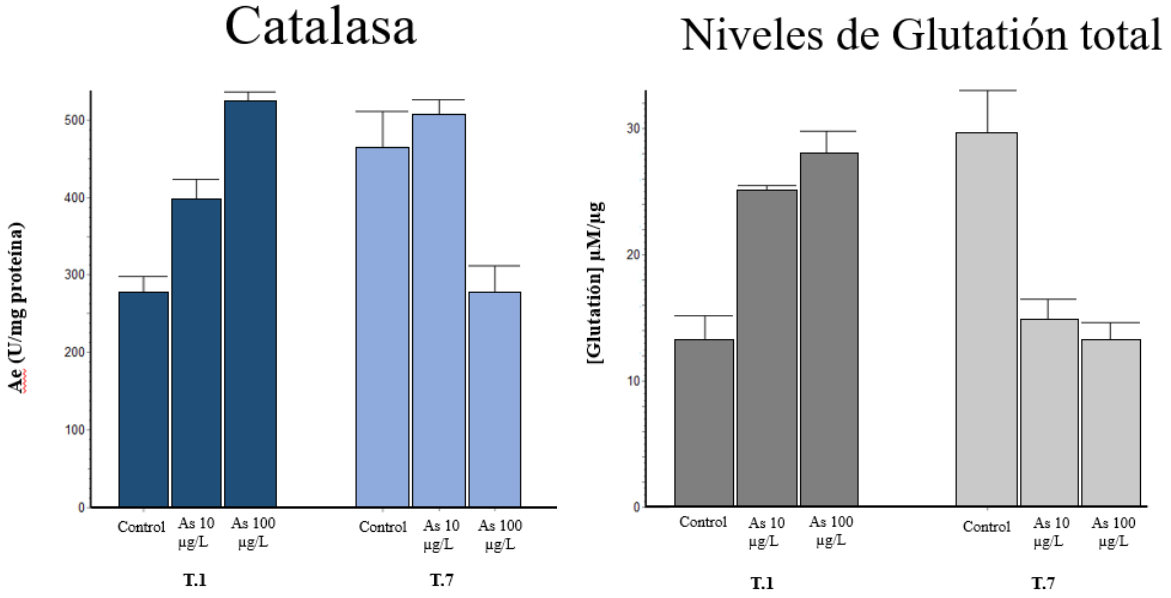


Figura 4. Actividad catalasa y niveles de glutatión total presentes en las muestras expuestas a arsénico. Se muestran los resultados de las exposiciones controladas de arsénico a concentraciones de 0, 10 y 100 µM, a tiempos de 1 y 7 días.

Conclusiones

- Los resultados obtenidos de las medidas de las actividades enzimáticas y niveles de MDA y glutatión de las muestras recogidas en el Estuario del Guadalquivir sugieren niveles más elevados de contaminación en la zona de Bonanza.

- Estudios de exposición controlada muestran un aumento de las actividades enzimáticas medidas con concentraciones crecientes de arsénico cuando *S. plana* se somete a la presencia del metal durante un tiempo de un día, ocurriendo lo contrario a los 7 días.

Bibliografía

[1] V. Funes, J. Alhama, J. I. Navas, J. López-Barea and J. Peinado, *Environ. Pollut.*, 2006, 139, 214–23.

[2] A. Romero-Ruiz, O. Amezcua, M. J. Rodríguez-Ortega, J. L. Muñoz, J. Alhama, A. Rodríguez-Ariza, J. L. Gómez-Ariza and J. López-Barea, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, 22, 92–100.

Capítulo 38. Desarrollo de un biosensor de flujo lateral para la determinación de residuos de alérgenos en alimentos

Mª del Valle Zurita Lozano, Mª de la Paz Aguilar Caballos

Departamento de Química Analítica. Instituto Universitario de Química Fina y Nanoquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba. Anexo al edificio Marie Curie. Campus Universitario de Rabanales. 14071-Córdoba. Spain. E-mail: b22zulom@uco.es

Resumen

Se presenta el desarrollo de un biosensor plano para la detección de alérgenos, concretamente de proteínas de soja, en muestras de alimentos utilizando nanopartículas de oro (AuNPs) conjugadas con anticuerpos anti-proteína de soja. El biosensor de flujo lateral se ha diseñado con un formato de ensayo competitivo sobre nitrocelulosa reforzada como componente principal, y fibra de vidrio y fibra de celulosa, como materiales de los componentes secundarios. El estándar de soja y los anticuerpos anti-IgG de conejo fueron inmovilizados en la membrana de nitrocelulosa, la cual se había bloqueado previamente con albúmina de suero bovino para minimizar las interacciones inespecíficas. Una vez preparado el biosensor, éste puede ser almacenado para su posterior utilización. Este biosensor puede llegar a detectar la presencia de soja en concentraciones iguales o superiores a 1,75 µg/mL sin pérdida de la respuesta a altas concentraciones de proteína de soja. La utilidad práctica del biosensor plano desarrollado se ha confirmado mediante los resultados del análisis de muestras que contenía soja y, también libres de soja, como leche de vaca, los cuales han sido satisfactorios.

Fundamento

La sociedad actual demanda la obtención rápida de resultados, lo que propicia el desarrollo de nuevas metodologías analíticas de respuesta rápida, fiables y sencillas de aplicar. Los ensayos de flujo lateral, también denominados ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral o biosensores de flujo lateral [1], son dispositivos basados en el movimiento de la muestra a través de una superficie plana mediante fuerzas capilares, donde la visualización de la presencia del analito en la muestra se realiza mediante reacciones antígeno-anticuerpo. Estos dispositivos están generalmente formados por cuatro componentes [2]: almohadilla de muestra "sample pad", almohadilla de conjugado "conjugate pad", membrana de reacción y almohadilla absorbente "absorbent pad".

Aunque inicialmente estos biosensores se utilizaron mayoritariamente en el ámbito clínico, su uso se ha expandido a otras áreas por las ventajas que ofrecen: buena reproducibilidad, estabilidad prolongada, uso por personal no especializado, económicamente asequibles…; aunque no están exentos de limitaciones: variaciones entre lotes, señales de baja intensidad, requieren tratamiento previo de las muestras, etc.

En los últimos años, se han desarrollado multitud de aplicaciones de los biosensores en el ámbito alimenticio [3]: detección de hormonas, de antibióticos de uso veterinario, de contaminantes y de alérgenos. En este caso, el biosensor se centra en la detección de las proteínas de la soja [4], uno de los ocho alérgenos más importantes ya que su adición no declarada a los alimentos supone un riesgo potencial para los individuos alérgicos.

El biosensor se ha desarrollado con un formato de ensayo competitivo, el cual utiliza dos anticuerpos diferentes: un anticuerpo primario anti-analito que se une a la partícula marcadora para formar el conjugado, y un anticuerpo anti-especie capaz de reaccionar con los anticuerpos primarios anti-analito, el cual se dispensa sobre la membrana para constituir la línea de control. De forma adicional, se inmoviliza sobre la membrana el antígeno macromolecular que origina la línea de ensayo. Cuando se adiciona la muestra, el analito presente satura los anticuerpos del conjugado, lo que impide su unión con la línea de ensayo y continúa migrando hasta quedar retenido en la línea control. En un ensayo competitivo positivo, la aparición de una única línea, la línea control, informa de la presencia del analito en la muestra. Este biosensor pretende ser una alternativa a otros métodos inmunoquímicos, tales como inmunoensayos ELISA descritos para tal fin [5, 6].

Metodología

Las investigaciones realizadas se han centrado en diferentes aspectos del desarrollo del biosensor, tales como: 1) Selección del nanomaterial más adecuado para formar el conjugado, 2) Síntesis del conjugado AuNPs-anticuerpos anti-proteínas de soja, 3) Montaje del biosensor, donde se menciona cómo se preparan el "sample pad", la membrana y el "absorbent pad", 4) Determinación del intervalo de trabajo del biosensor y 5) Análisis de las muestras reales de alimentos.

Resultados

Las variables experimentales que influyen en las características del biosensor se optimizaron mediante el método univariante. A continuación, se muestran los resultados más relevantes obtenidos en dicho estudio y en los ensayos de verificación de funcionamiento del biosensor.

1. Elección de los componentes del biosensor: Para la elección de la membrana se partió del material de nitrocelulosa proporcionado por Millipore, que incorpora una lámina de plástico

que impide la pérdida de muestra o conjugado a través de la membrana. En este caso, la membrana HF180 resultó ser la más adecuada, ya que la muestra en algunos casos podría ser limitada, y se necesitaba una elevada sensibilidad para evitar falsos negativos.

En relación a la almohadilla absorbente, se evaluaron varios materiales mediante la adición de un mismo volumen de conjugado a membranas de distintos materiales: papel de filtro, fibra de celulosa, fibra de vidrio, entre otros, observándose una mejor absorción del fluido con la fibra de celulosa, en concreto, con dos láminas deeste material superpuestas.

Para la almohadilla del conjugado, se ensayaron distintos materiales, pero en todos ellos el conjugado quedaba retenido, aun bloqueando dichos materiales con albúmina de suero bovino para minimizar las interacciones no específicas. Por lo tanto, se decidió depositar 50 µL del conjugado al inicio de la membrana de nitrocelulosa que proporcionó una sensibilidad adecuada.

El material empleado para la almohadilla de muestra fue la fibra de vidrio por ser un material poroso que permite el paso adecuada de la muestra hacia la membrana.

2. Optimización de la línea de ensayo y de la línea de control: La línea de ensayo del biosensor se preparó a partir de un estándar de soja (5000 µg/mL), del que se prepararon distintas diluciones hasta conseguir una línea definida y con la menor concentración de soja posible para que el ensayo fuese lo más sensible posible. Dicha característica se obtuvo utilizando la concentración de 100 µg/mL y dos dispensaciones.

Una vez optimizada la línea de ensayo, se optimizó la línea de control, la cual se preparó dispensando diluciones de anticuerpos anti-IgG de conejo producidos en cabra. Se observó que la línea control preparada con la dilución de 1/500 no presentaba una intensidad tan alta en comparación con las otras líneas, por lo que se decidió emplear la dilución 1/100 con dos dispensaciones. El esquema del biosensor desarrollado es el que se muestra en la Figura 1:

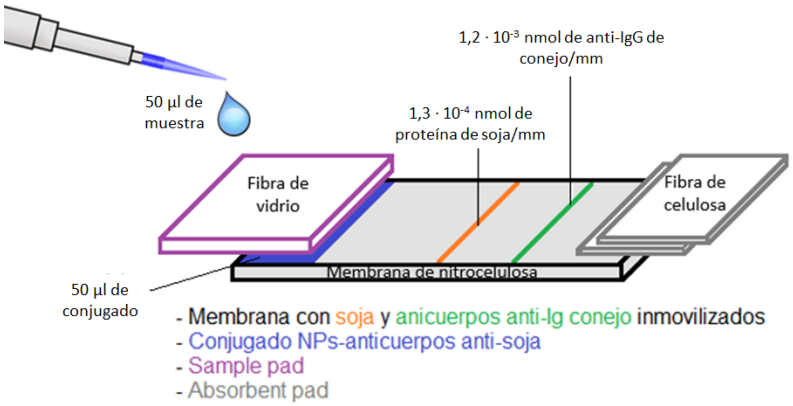


Figura 1. Esquema del biosensor desarrollado.

3. Determinación del intervalo de trabajo del biosensor de flujo lateral: Una vez optimizado el diseño del biosensor se procedió a determinar el intervalo de trabajo mediante el ensayo de varias disoluciones estándar de proteína de soja: 0 (blanco), 1, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 5, 10, 30 y 50 µg/mL. Se visualizó la concentración mínima que el biosensor era capaz de detectar era 1,75 µg/mL de proteína de soja.

4. Estudio de selectividad: Las muestras de alimentos susceptibles de ser analizadas pueden portar otro tipo de alérgenos como son las caseínas y las gliadinas. Se realizó un estudio de selectividad para verificar que el biosensor no proporcionara falsos positivos por la presencia de estos alérgenos. Para ello, se ensayaron dos concentraciones diferentes, 500 y 2000 µg/mL, de caseínas y de gliadinas. Todos los ensayos resultaron negativos, lo que demostró la selectividad del biosensor para las proteínas de soja. Es decir, el biosensor no proporciona falsos positivos en presencia de otras proteínas alérgenas como son caseínas y gliadinas.

5. Análisis de muestras reales: La utilidad práctica del biosensor para el análisis de muestras reales se ensayó mediante el análisis de dos muestras que contenían soja, salsa de soja comercial y batido de chocolate de soja comercial; y una muestra carente de soja, leche de vaca comercial. Solo el ensayo con la muestra de leche resultó negativo; en los otros dos casos, al poseer soja, los ensayos fueron positivos.

Conclusiones

Se ha desarrollado un biosensor para la detección de proteínas de soja alérgenas, alternativo a los métodos ELISA convencionalmente utilizados para su determinación. El biosensor desarrollado tiene un formato de ensayo competitivo, por lo que se requiere tan sólo un anticuerpo específico frente al analito, lo que permite reducir el coste del ensayo. Los anticuerpos utilizados son anticuerpos comerciales, por lo que se elimina la necesidad de producirlos y aislarlos, al menos en las primeras etapas de desarrollo del biosensor. Igualmente, el uso de AuNPs comerciales permite contar con NPs homogéneas de tamaño controlado. El biosensor de flujo lateral es un método rápido, barato y de fácil manejo, lo que permite su uso sin necesidad del empleo de instrumentos o formación especializada. En lo referente a la sensibilidad, es más sensible que algunos métodos ELISA desarrollados con el mismo fin [5, 6], y consigue determinar en pocos minutos estas proteínas, a diferencia de los métodos ELISA, que requieren tiempos superiores a 2 horas. Una limitación del biosensor es que permite la determinación cualitativa de las proteínas de soja, pero no permite su cuantificación. Los resultados de su aplicación al análisis de muestras reales, tales como batido y salsa de soja han demostrado la utilidad práctica de este biosensor.

Bibliografía

[1] D. Quesada-González, A. Merkoçi, Nanoparticle-based lateral flow biosensors, Biosens. Bioelectron., 73 (2015) 47 – 63.

[2] E.B. Bahadir, M.K. Sezgintürk, Lateral flow assays: Principles, design and labels, Trends Anal. Chem. 82 (2016) 286 – 306.

[3] B.B. Dzantiev, N.A. Byzova, A.E. Urusov, A.V. Zherdev, Immunochromatographic methods in food analysis, Trends Anal. Chem. 55 (2014) 81 – 93.

[4] T. Wang, G.X. Qin, Z.W. Sun, Y. Zhao, Crit. Advances of Research on Glycinin and β-Conglycinin: A Review of Two Major Soybean Allergenic Proteins, Rev. Food. Sci. Nutr., 54 (2014) 850 – 862.

[5] L. L'Hocine, J.I. Boye, C. Munyana, Detection and quantification of soy allergens in food: study of two comercial enzyme-linked immunosorbent assays, J. Food Sci. 72 (2007) C145 – C153.

[6] L. Sánchez, M.D. Pérez, P. Puyol, M. Calvo, G. Brett, T.M.P. Cattaneo, W. Haasnoot, R. López-Fandino, M.A. Manso, L. Mata, P. Razquin, A. Sánchez, C. Svenning, G. Veraud, Determination of vegetal proteins in milk powder by enzyme linked immunosorbent assay, J. AOAC Int. 85 (2002) 1390 – 1397.

Ciencias Sociales y Jurídicas

Capítulo 39. Competencias sociales y emocionales en el alumnado perteneciente a diferentes grupos étnicos-culturales

María Fontans, Izabela Zych y Vicente J. Llorent

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias de la Educación. Departamento de Psicología

Avda. San Alberto Magno. E-mail: mfontanss@hotmail.com

Resumen

Este estudio se centra en la diversidad étnico-cultural en las escuelas y su relación con la inteligencia emocional percibida y las competencias socioemocionales. La finalidad del estudio es analizar dichas variables en grupos de minoría y mayoría étnica-cultural, para encontrar qué aspectos se han de trabajar para favorecer la educación inclusiva. Este estudio se realizó con una muestra representativa de 2.139 estudiantes de Educación Secundaria Obligatoria en Andalucía, pertenecientes a 22 colegios y 8 provincias. El estudio se llevó a cabo a través de una encuesta. Los resultados muestran que la diversidad está presente en las escuelas andaluzas con un 6,4% de inmigrantes de primera generación, 8,3% de inmigrantes de segunda generación y 4,7% de estudiantes de etnia gitana. No hay diferencias significativas en la inteligencia emocional percibida entre el grupo mayoritario y minoritario. También se encontró que hay una diferencia pequeña, pero significativa en una de las cinco competencias sociales y emocionales, concretamente en autoconocimiento. Se concluye que las competencias socioemocionales deben ser promovidas en todos los grupos étnico-culturales y teniendo en cuenta la diversidad de las aulas, la educación inclusiva debe ser fomentada.

Fundamento

La educación inclusiva es el proceso de cambio que abarca culturas, políticas y prácticas educativas [1]. La diversidad permite que los humanos se construyan como personas, pues el aprendizaje adquirido desde la educación en y para la diversidad desarrolla una convivencia basada en el respeto y cooperación.

Esta diversidad está presente en las sociedades y en las escuelas. En España hay 4.447.852 habitantes extranjeros [2] y aproximadamente 453.788 personas pertenecientes a la etnia gitana [3]. Las escuelas son cada vez más diversas culturalmente y, es por ello, que es conveniente describir dicha diversidad para favorecer una atención educativa y de calidad a todo el alumnado.

En las escuelas surgen multitud de situaciones con un gran carácter emocional y social. La diversidad que existe en las aulas hace que también sean diversos los estados emocionales y la relaciones sociales que aparecen en la escuela. El aprendizaje social y emocional es el proceso por el que se adquiere unas competencias básicas que favorecen las relaciones con los demás y uno mismo y permiten reconocer y manejar las emociones [4]. Así pues, conocer el nivel de competencia socioemocional de los alumnos permitirá guiar la práctica educativa promoviendo grandes beneficios [5].

Estas variables son clave para la mejora de las relaciones con los demás y con uno mismo en contextos de diversidad étnica y cultural, lo cual permitirá la construcción de una educación inclusiva. Así pues, la presente investigación tiene como objetivo describir la diversidad étnica-cultural del alumnado, esperando encontrar presencia de diferentes grupos culturales en las escuelas andaluzas. Además, se pretende describir y comparar el nivel de los diferentes grupos étnico-culturales, en relación a su inteligencia emocional percibida y competencias socioemocionales, afirmando como hipótesis nula que no existen diferencias entre los grupos.

Metodología

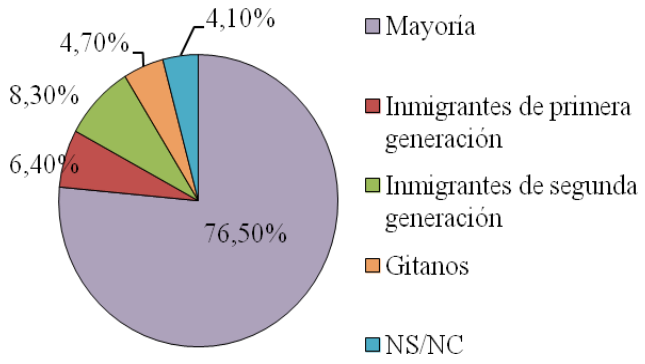
La muestra está compuesta por un total de 2.139 alumnos de Educación Secundaria Obligatoria de Andalucía. Formada por 1.088 mujeres (50,9%) y 1.026 varones (48%). La edad media de los sujetos es de 13,79 años (DT = 1,396).

Se han utilizado dos escalas autoinforme. Una, utilizada para analizar las competencias socioemocionales del alumnado (SEC-Q, *Social and Emotional Competencies Questionnaire*) [6]. Otra, utilizada para evaluar el nivel de inteligencia emocional percibida (TMMS-24, *Trait Meta Mood Scale*) [7]. Ambas con unos índices de fiabilidad altos en el presente estudio (α = 0,82; Ω = 0,82 y α = 0,94; Ω = 0,94, respectivamente).

El diseño empleado en la investigación ha sido descriptivo y comparativo. Una vez seleccionados los centros a través de un muestreo representativo, se contactó con el equipo directivo de los centros para pedir su participación voluntaria en la investigación. La cumplimentación de los cuestionarios ocupó aproximadamente 30 minutos. Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS en su versión 18, EQS y Factor en su versión 10.3. Para un conocimiento más específico sobre la existencia de las diferencias encontradas se ha utilizado la prueba d de Cohen.

Resultados

Figura 1. *Porcentajes según grupos étnico-culturales*



Los resultados muestran que el 76,5% del alumnado de la ESO de Andalucía pertenece al grupo mayoritario y el 19,4% al grupo minoritario. Los grupos minoritarios más representados son los inmigrantes de segunda generación, seguidos de los inmigrantes de primera generación y, por último, los estudiantes de etnia gitana (Figura 1). La provincia con mayor diversidad étnico-cultural es Almería, con un porcentaje de 54,2% (*RTC* = 6,4) pertenecientes al grupo mayoritario. Córdoba destaca por ser la provincia que tiene menor diversidad, al tener un 88,8% (*RTC* = 3,2) de estudiantes pertenecientes al grupo mayoritario.

Los resultados inferenciales muestran que no existen diferencias entre el grupo mayoritario y minoritario en la inteligencia emocional percibida de los estudiantes y, tampoco entre cada uno de los cuatro grupos étnico-culturales estudiados. En el caso de las competencias socioemocionales, sí existen diferencias entre el grupo mayoritario y minoritario. Del mismo modo, al comparar los cuatro grupos estudiados, los resultados muestran diferencias concretamente en la variable autoconocimiento (Tabla 1). La prueba d de Cohen señala una diferencia significativa (95% IC = 0,11 - 0,47) con un tamaño del efecto pequeño en la variable autoconocimiento entre el grupo mayoritario y alumnos inmigrantes de primera generación (d = 0,29), y también, es significativa (95% IC = 0,04 - 0,44) con un tamaño del efecto pequeño entre el grupo mayoritario y los alumnos etnia gitana (d = 0,24).

Tabla 1. Comparación del nivel de Inteligencia Emocional Percibida y Competencias Socioemocionales entre los grupos étnico-culturales

Variables	*Mayoría*	*Inmigrantes de primera generación*	*Inmigrantes de segunda generación*	*Etnia gitana*	
	M (DT)	*M (DT)*	*M (DT)*	*M(DT)*	F
Atención emocional	*3,14 (1)*	*2,98 (1,07)*	*3,04 (1,05)*	*3,22(1,11)*	*1,521*
Comprensión emocional	*3,31(0,95)*	*3,25 (1,1)*	*3,33 (1,05)*	*3,42(1,16)*	*0,414*
Regulación emocional	3,49(0,93)	*3,4 (1,03)*	*3,48 (1,02)*	*3,53(1,16)*	*0,318*
Total TMMS-24	3,31(0,77)	*3,22 (0,83)*	*3,32 (0,89)*	*3,46(0,99)*	*1,089*
Autoconocimiento	*4,03(0,65)*	*3,83 (0,83)*	*3,98 (0,76)*	*3,87(0,86)*	*3,194**
Autogestión	*4,06(0,78)*	*4,07 (0,84)*	*3,98 (0,81)*	*4,04(0,92)*	*0,557*
Conciencia y habilidad social	*3,97(0,54)*	*3,86 (0,65)*	*3,98 (0,58)*	*3,91(0,74)*	*1,346*
Toma de decisiones	*3,57(0,91)*	*3,55(0,88)*	*3,48 (0,95)*	*3,38(1,05)*	*1,843*
Total SEC-Q	*3,94 (0,46)*	*3,84 (0,53)*	*3,89 (0,51)*	*3,81(0,66)*	*2,442*

*$p < 0,05$

Conclusiones

Los resultados han confirmado la presencia de diversidad étnico-cultural en las escuelas andaluzas y, además, esta difiere en función de las provincias. Según el presente estudio la provincia con mayor diversidad es Almería, lo cual coincide con los datos del Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía [8]. La segunda hipótesis planteaba que no se encontrarían diferencias entre los grupos étnico-culturales en las variables estudiadas. Por un lado, el presente estudio no encontró diferencias en inteligencia emocional percibida entre los grupos. El hecho de no hallar diferencias en la inteligencia emocional percibida entre los grupos étnico-culturales revela que los alumnos de la ESO en Andalucía, independientemente de su origen étnico o cultural se perciben con una atención, comprensión y regulación emocional similar. No obstante, otros estudios afirman encontrar diferencias en atención y comprensión emocional entre grupos con diferentes orígenes culturales [9]. En cuanto a las competencias socioemocionales, el presente estudio halló diferencias con un tamaño del efecto pequeño en la variable autoconocimiento entre el grupo mayoritario y los inmigrantes de primera generación y gitanos. Este dato revela la necesidad de profundizar en la identificación de las propias emociones y sentimientos de todos los alumnos, y en especial para los grupos con un menor nivel de esta competencia. Algunos estudios, prueban que existen diferencias entre grupos culturales en cuanto a competencias socioemocionales. Una investigación llevada a cabo en aulas culturalmente diversas de Almería, encontró diferencias significativas en la variable conocimiento de sí mismo, lo cual coincide con este estudio [10].

La presente investigación resulta relevante para la aportación científica en materia educativa. Pues, la escuela tiene un papel sustancial y las estrategias que se utilicen en la enseñanza, así como la actitud de los docentes hacia la diversidad cultural, serán determinantes para el fomento de las habilidades sociales y emocionales desde la inclusión.

Bibliografía

[1] Ainscow, M., Booth, T. & Dyson, A. (2006). *Improving schools, developing inclusion*. London: Routledge.

[2] Instituto Nacional de Estadística. INE, (2015). Estadística de Adquisiciones de Nacionalidad Española (ANES). Datos definitivos de 2014 y provisionales del primer semestre de 2015. Recuperado de http://www.ine.es/inebaseDYN/anes30279/anes_inicio.htm

[3] Fundación de Secretariado Gitano. FSG, (2009). Mapa sobre Vivienda y Comunidad Gitana en España, 2007: conclusiones, recomendaciones y propuestas. *Revista Bimestral de la Fundación de Secretariado Gitano*, 3, 33-48.

[4] Elias, M. J., Zins, J.E., Weissberg, R.P., Frey, K.S., Greenberg, M.T., Haynes, N.M.,... Shriver, T.P. (1997). Promoting social and emotional learning: Guidelines for educators. Alexandria, VA: *Association for Supervision and Curriculum Development*, ASCD.

[5] Durlak, J. A., Weissberg, R. P., Dymnicki, A. B., Taylor, R. D. y Schellinger, K. B. (2011). The impact of enhancing students' social and emotional learning: A meta-analysis of school-based universal interventions. *Child Development*, 82(1), 405–432.

[6] Zych, I., Ortega-Ruiz, R., Muñoz-Morales, R. & Llorent, V. J. (2016). Dimensions and Psychometric Properties of the Social and Emotional Competencies Questionnaire (SEC-Q). (en prensa).

[7] Fernández-Berrocal, P., Extremera, N. y Ramos, N. (2004). Validity and reliability of the Spanish modified version of the Trait Meta-Mood Scale. *Psychological Reports*, 94, 751-755.

[8] Instituto de Estadística y Cartografía de Andalucía. IECA, (2014). La población de Andalucía en 2014: 8.392.635 de habitantes. *Consejería de economía y conocimiento*.

[9] Martines, D., Fernández-Berrocal, P. & Extremera, N. (2006). Ethnic group differences in perceived emotional intelligence within the United States and Mexico. *Ansiedad y Estrés,* 12(2), 317-327.

[10] Soriano-Ayala, E. y Osorio-Méndez, M. M., (2008). Competencias socioemocionales del alumnado "autóctono" e inmigrante de educación secundaria. *Bordón*, 60(1), 129-148.

Capítulo 40. La nueva dimensión de la jurisdicción consultiva del Tribunal Internacional del Derecho del Mar tras su dictamen de 2 de abril de 2015

Eduardo Jiménez Pineda

Universidad de Córdoba. Facultad de Derecho y Ciencias Empresariales y Económicas. Departamento de Ciencias Jurídicas Internacionales e Históricas y Filosofía del Derecho.

E-mail: eduardojimenezpineda94@gmail.com

Resumen

El dictamen de 2 de abril de 2015 dado por el Tribunal Internacional del Derecho del Mar (TIDM) a petición de la Comisión Subregional de Pesca constituye la primera opinión consultiva dada por la formación plenaria de este Tribunal. En esta comunicación analizamos los aspectos jurisdiccionales de la citada resolución, dejando al margen los distintos aspectos sustantivos que se ventilan en la misma. Para ello, partimos de los argumentos favorables y contrarios esgrimidos por los distintos intervinientes en el procedimiento y finalizamos con las conclusiones que formula el Tribunal en su dictamen, teniendo igualmente presentes los matices introducidos por algunos de sus magistrados en las declaraciones y opiniones separadas que lo acompañan. Tras nuestro estudio, concluimos que este dictamen ha venido a corroborar las atribuciones consultivas de la formación plenaria del Tribunal, las cuales se fundamentan jurídicamente en el artículo 21 de su Estatuto y en el renvío que formula a *otro acuerdo* internacional. Por este motivo, creemos que este dictamen supone un considerable progreso debido a las posibilidades que permite. Finalmente, concluimos que la jurisdicción consultiva del plenario del TIDM se podrá ejercer siempre que se cumplan las condiciones requeridas por el artículo 138 de su Reglamento.

Fundamento

El punto de partida de esta investigación reside, en primer lugar, en la innovación que supone nuestro objeto de estudio en el campo del Derecho del Mar, puesto que, dada la reciente fecha de emisión de la mencionada opinión consultiva (a saber, 2 de abril de 2015), no existen abundantes investigaciones que analicen la profundidad y repercusión de dicha resolución.

El papel que juega el Tribunal Internacional del Derecho del Mar (TIDM) como órgano judicial puede verse reforzado si, como pretendemos dilucidar, su formación plenaria está investida de competencia en materia consultiva. Esta vía permitiría a este órgano judicial internacional evitar futuras controversias a través de la emisión de dictámenes consultivos que establezcan las pautas por las que puedan guiarse los Estados.

Metodología

En nuestro estudio, hemos creído conveniente comenzar contextualizando la jurisdicción consultiva del TIDM. Ésta, en un primer momento y con arreglo a la CNUDM, se limitaba a la Sala de Controversias de los Fondos Marinos (SCFM) para conocer de ciertas cuestiones relacionadas con la *Zona* y únicamente si le eran planteadas por los órganos, habilitados a tal fin, de la Autoridad Internacional de los Fondos Marinos [1]. Posteriormente, el Tribunal, a través de su Reglamento, amplió su competencia consultiva a su formación plenaria, atribuyéndose la capacidad para emitir opiniones consultivas sobre cuestiones legales cuando esta posibilidad esté expresamente prevista en un tratado concerniente a los fines de la Convención [2].

Tras este planteamiento introductorio, nos hemos planteado las consecuencias que se pueden derivar de un pronunciamiento de índole consultivo. A renglón seguido y centrándonos en nuestro principal objeto de estudio, hemos proseguido analizando las diferentes posiciones y argumentos de los Estados y Organizaciones Internacionales que han intervenido en el procedimiento, sometiendo el escrito en el que reflejaban su posición al Tribunal. Seguidamente, nos hemos detenido en las consideraciones que, respecto a su jurisdicción consultiva, acomete el propio Tribunal en su pronunciamiento de 2 de abril de 2015. Finalmente, hemos considerado oportuno prestar atención a las declaraciones y opiniones separadas realizadas por algunos de los magistrados que constituyeron el plenario del Tribunal en el momento de la emisión del dictamen.

Resultados

En cuanto a los "efectos" predicables de un dictamen consultivo, entendemos que los mismos, con independencia del destino que en la fase *post opinio* el órgano solicitante dé al dictamen, albergan un indudable valor intrínseco, consustancial y contribuyen a fijar las pautas a seguir en cuestiones semejantes a aquellas que han sido objeto de pronunciamiento consultivo. Así, podemos afirmar que las opiniones consultivas gozan de un gran valor jurídico, político y moral derivado de la calidad del órgano que las emite y la cualidad jurídica que en sí misma encierran.

Respecto a las posiciones de los intervinientes en el curso del procedimiento, podemos resumirlas como sigue: 1) las de aquellos tácitamente favorables a la jurisdicción consultiva del plenario (bien porque no participan en el procedimiento o bien porque intervienen pero omitiendo la cuestión competencial); 2) las de los intervinientes que expresamente fueron partidarios de reconocer atribuciones consultivas al Pleno del Tribunal; 3) las de aquellos Estados que fueron contrarios a la jurisdicción consultiva de la formación plenaria y que representaron la posición minoritaria en el procedimiento.

Tras el análisis de las distintas posiciones, hemos deducido que los principales argumentos a favor de la jurisdicción consultiva del Pleno son: 1) la consideración del artículo 21 del Estatuto como fundamento jurídico suficiente para la competencia consultiva del Pleno del TIDM, sin que haya motivo para entender que en la expresión *todas las cuestiones* no tengan cabida las opiniones consultivas; 2) la configuración del artículo 21 para hacer del TIDM una institución viva y permitir a los Estados la conclusión de tratados que le confieran jurisdicción; 3) la fijación por el artículo 138 del Reglamento de las condiciones para el ejercicio de la competencia consultiva y no de un nuevo tipo de competencia; 4) finalmente, se expuso que en caso de que la intención de los negociadores de la CNUDM hubiera sido limitar a asuntos contenciosos la competencia del TIDM habrían empleado la expresión *confiera competencia* contenciosa *al Tribunal* en el artículo 21 del Estatuto y no la genérica expresión *confiera competencia al Tribunal*.

Por su parte, los principales argumentos expuestos en aras de contrarrestar las atribuciones consultivas del plenario pueden resumirse de la siguiente manera: 1) la ausencia de referencias en la CNUDM a la competencia consultiva del Pleno con la consiguiente decisión u*ltra vires*; 2) la carencia de *poderes implícitos* para atribuirse competencia consultiva; la insuficiencia del artículo 138 del Reglamento como fundamento de la competencia consultiva, por cuanto las normas procedimentales no pueden prevalecer sobre la CNUDM; 3) la interpretación coherente del artículo 21 del Estatuto con el 288 parágrafo 2º de la CNUDM junto con la ubicación sistemática del artículo 288 en la Parte XV de la CNUDM relativa a la solución de controversias, que provocan la regulación de consuno de la jurisdicción contenciosa; 4) la omisión de una disposición expresa que confiera jurisdicción consultiva al Tribunal como reflejo de la inexistencia de tal intención por los negociadores de la CNUDM; 5) entender que la expresión *all matters* de la versión inglesa del artículo 21 del Estatuto se refiere a los asuntos contenciosos puesto que en ese sentido se utiliza en el artículo 36, parágrafo 1º del Estatuto de la Corte Internacional de Justicia; 6) en todo caso, el incumplimiento de las tres condiciones requeridas en el artículo 138 del Reglamento del TIDM en el caso específico del dictamen solicitado por la Comisión Subregional de Pesca (CSRP).

En cuanto a los pronunciamientos del TIDM, en primer lugar, declara que el Estatuto ocupa el mismo rango que la CNUDM, de forma que el primero no está subordinado a la segunda y es aplicable de pleno derecho e independientemente. Aunque ninguno de estos instrumentos se refiere expresamente a la competencia consultiva del TIDM, la expresión "*todas las cuestiones*" del artículo 21 del Estatuto debe entenderse como acogedora de la competencia contenciosa y de la competencia consultiva, dado que no existe ninguna razón para interpretar tal expresión de forma restrictiva.

Por otra parte, la fundamentación jurídica de la competencia consultiva del Pleno es situada en la remisión a "*otro acuerdo*" que aparece en el artículo 21 del Estatuto en relación con el conjunto del citado artículo 21. El artículo 138 del Reglamento estipula las tres condiciones que deben cumplirse para el ejercicio de la competencia consultiva, que estima el Tribunal que concurren en este asunto: un acuerdo, referido a los objetivos de la CNUDM, que prevea expresamente la sumisión de una solicitud de opinión consultiva al TIDM; que la solicitud sea sometida al TIDM por algún órgano autorizado a tal efecto en virtud de ese acuerdo; que la opinión pueda ser concretada en una cuestión jurídica. Asimismo, la competencia de la que el Pleno del TIDM se inviste para conocer de la opinión consultiva número 21 se limita a la Zona Económica Exclusiva (ZEE) de los Estados Miembros de la CSRP, desterrando la

posibilidad alegada por los Estados contrarios de verse involucrados por una resolución para la que no habían prestado su consentimiento.

Por último, consideramos que, a pesar de que la opinión consultiva número 21 contiene dos declaraciones y tres opiniones separadas, no se rompe la uniformidad del Tribunal porque la cuestión jurisdiccional ha sido resuelta por unanimidad.

Conclusiones

El reciente dictamen de 2 de abril de 2015 ha venido a certificar la competencia consultiva de la formación plenaria del Tribunal. Este pronunciamiento constituye un muy importante avance debido a las enormes posibilidades que ofrece en relación con la jurisdicción consultiva, que se podrá ejercer siempre que se cumplan las condiciones requeridas por el artículo 138 del Reglamento del Tribunal. La fundamentación jurídica de ésta reside en el artículo 21 del Estatuto y en el renvío que formula a otro acuerdo internacional. No obstante, hubiera podido resultar más coherente y garantista, como se apunta en algunas declaraciones y opiniones separadas, fundamentar la competencia consultiva del plenario en la relación de los artículos 16 y 21 del Estatuto, 138 del Reglamento y el acuerdo internacional que habilite la sumisión de la solicitud de opinión consultiva. Por último, parece aconsejable la modificación del artículo 21 para la concreción de la jurisdicción consultiva tanto *ratione materiae* como *ratione personae* y despejar dudas respecto a opiniones consultivas futuras.

Bibliografía y notas

[1] M. García García-Revillo, *El Tribunal Internacional del Derecho del Mar: origen, organización y competencia*. Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación, Córdoba, 2005, pp. 560-561.

[2] En este sentido, es muy revelador M. García García-Revillo, *The Contentious and Advisory Jurisdiction of the International Tribunal for the Law of the Sea*, BRILL NIJHOFF, 2015, pp. 310-313.

Capítulo 41. Propuesta de análisis para la evaluación de la calidad de los MOOC para la formación permanente del profesorado de inglés como L2

Francisco Javier Palacios Hidalgo

Co-autora: Cristina Aránzazu Huertas Abril

Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias de la Educación. Departamento de Filología Inglesa y Alemana.

Avda. San Alberto Magno s/n. E-mail: m22pahif@uco.es

Resumen

Partiendo de las características del panorama socioeducativo actual en el que la lengua inglesa se ha establecido como *lingua franca*, las TIC en general (y los MOOC en particular) se presentan como herramientas formativas para el aprendizaje de lenguas con un potencial inigualable. Considerando esto, el presente trabajo se plantea como objetivo el diseño de un instrumento que permita analizar la calidad y pertinencia de los MOOC para la educación y la formación del profesorado de inglés como L2 (en activo y en formación) en relación al desarrollo de competencias comunicativas.

Para ello, se ha diseñado un cuestionario de evaluación que atiende a aspectos como la guía didáctica, la metodología seguida, la adecuación y calidad de contenidos y recursos didácticos, el estilo del lenguaje empleado, la adaptación a las necesidades de los usuarios y los métodos de evaluación planteados.

Esta herramienta pretende establecer un punto de partida para la evaluación de este tipo de MOOC y, a su vez, sugerir un nexo de unión entre los participantes en la creación, el desarrollo y la evaluación para mejorar su calidad y usabilidad por parte del profesorado de L2 y su didáctica.

Fundamento

En la actualidad, nos encontramos inmersos en una realidad en la que las TIC desempeñan un papel fundamental en todos los ámbitos de la vida. Su uso desde la Educación Infantil hasta más allá de la Educación Superior gracias al aprendizaje a lo largo de la vida está desarrollando nuevas y potentes vías que permiten un rápido acceso a información de calidad. En este contexto surgen los MOOC [1], cursos de acceso libre y gratuito en los que el alumnado interesado interviene y colabora con compañeros de todos los rincones del mundo, teniendo libertad para decidir cómo, cuándo y cuánto participar.

Si bien estos cursos son una revolución en el ámbito educativo, diversos enfoques señalan su lado negativo apoyándose en argumentos tales como su carencia de rigor pedagógico [2], su alta tasa de abandono [3] o el modelo de negocio oculto en que se basan a través de la expedición de certificados [4].

Numerosos han sido los autores que han tratado de elaborar una detallada clasificación de las diferentes categorías de MOOC; sin embargo, lo más habitual es considerar los dos tipos básicos más conocidos: xMOOC y cMOOC [5,6]. Los primeros suelen ser cursos tradicionales de *e-learning* universitarios adaptados a las peculiaridades de las plataformas MOOC, mientras que los segundos hacen mayor hincapié en la conectividad entre alumnos.

Centrándonos en los cMOOC, se ve claro cómo estos contribuyen al desarrollo y se fundamentan en los pilares básicos de la Educación (a saber: aprender a conocer, aprender a hacer, aprender a vivir juntos y aprender a ser). Así, utilizarlos implica actuar en pro del aprendizaje activo, participativo y colaborativo, puesto que el conocimiento es compartido; además, este aprendizaje se construye haciendo, paso a paso. Por supuesto, las tareas y el grado de aprovechamiento dependen directamente de la implicación de los participantes y de su relación con el resto; sin embargo, el componente motivacional intrínseco de estos recursos parece ayudar a que la participación sea suficiente para la generación del conocimiento.

La irrupción de estos cursos en el panorama educativo global tampoco pasa desapercibida en el contexto de los procesos de enseñanza-aprendizaje de lenguas extranjeras. Así, desde el punto de vista del profesorado en formación, existe un gran número de MOOC englobado dentro de categorías relacionadas con la enseñanza y la formación del profesorado que pueden ser relevantes también desde una perspectiva de mejora y consolidación del inglés como segunda lengua (L2), de forma simultánea a la adquisición de contenidos relacionados con la mejora de su labor docente.

Metodología

En los últimos años, ha habido diversas propuestas de evaluación de la calidad pedagógica de los MOOC desde una perspectiva amplia [7], e incluso con fines específicos [8]; sin embargo, su vinculación con el proceso de enseñanza-aprendizaje del inglés como lengua extranjera para profesorado en formación aún no ha sido abordado en profundidad.

Así, el objetivo principal que nos planteamos es el diseño de una herramienta que permita analizar la calidad y la pertinencia de los MOOC relacionados con el campo de la educación y la formación del profesorado de inglés como L2.

Resultados

Tras una exhaustiva revisión y análisis documental de bibliografía de interés y cursos masivos, nos encontramos en la situación de poder diseñar un cuestionario con el que evaluar

la calidad de los MOOC para la formación permanente del profesorado de inglés. Este se compone de 27 ítems distribuidos en siete dimensiones; todos ellos se expresarán en una escala Likert de 4 puntos (1 = nunca; 2 = casi nunca, 3 = casi siempre, 4 = siempre).

A continuación, se presenta dicha herramienta:

Tabla 1. Cuestionario de evaluación de la calidad de los MOOC para la formación permanente del profesorado de inglés

SOBRE LA GUÍA DIDÁCTICA				
1. ¿Los objetivos del curso se presentan de forma explícita y clara?	1	2	3	4
2. ¿Los contenidos del curso se presentan de forma explícita?	1	2	3	4
3. ¿Se hace mención a las competencias que se alcanzarán con el desarrollo del curso?	1	2	3	4
4. ¿Se hace mención al profesorado/tutor del curso?	1	2	3	4
5. ¿Se hace mención al tipo de evaluación que se utilizará para la superación del curso?	1	2	3	4
SOBRE LA METODOLOGÍA				
6. ¿La estructura del curso es adecuada para la alcanzar los objetivos y asimilar los contenidos planteados?	1	2	3	4
7. ¿La planificación permite abordar la asimilación de los contenidos y el logro de los objetivos planteados?	1	2	3	4
8. ¿Se fomenta una metodología activa donde se promueva la interacción de los distintos participantes (alumno-profesor/tutor, alumno-alumno)?	1	2	3	4
9. ¿Las actividades planteadas permiten alcanzar los objetivos y asimilar los contenidos planteados?	1	2	3	4
SOBRE LA ADECUACIÓN DE LOS CONTENIDOS				
10. ¿La información está actualizada?	1	2	3	4
11. ¿Se presenta una bibliografía adecuada para los contenidos del MOOC y, a su vez, de utilidad para el profesorado del área de inglés como L2 (como alumno del mismo)?	1	2	3	4
12. ¿Las referencias bibliográficas están actualizadas?	1	2	3	4
SOBRE LOS RECURSOS DIDÁCTICOS				
13. ¿Se ofrece material audiovisual que permita asimilar los contenidos del curso?	1	2	3	4
14. ¿Presenta el curso algún tipo de esquema, resumen o síntesis de los contenidos para facilitar al profesorado del área de inglés (como alumno del mismo) la asimilación de los mismos?	1	2	3	4
15. ¿Ofrece el curso materiales complementarios o medios de comunicación con el resto de participantes (alumno-profesor/tutor, alumno-alumno)?	1	2	3	4
16. ¿Se incluyen ejemplos de tareas para facilitar al profesorado del área de inglés (como alumno del mismo) la realización de las tareas propuestas?	1	2	3	4
SOBRE EL ESTILO DEL LENGUAJE				

17. ¿Se utiliza un registro sin excesivos tecnicismos adecuado al profesorado del área de inglés (como alumno del curso)?	1	2	3	4
18. ¿Presenta el curso errores ortotipográficos?	1	2	3	4
19. ¿Se adapta el curso a las normas de coherencia y cohesión textual?	1	2	3	4
SOBRE LA PERSONALIZACIÓN				
20. ¿Se recogen elementos que favorezcan la motivación del profesorado del área de inglés (como alumno del mismo)?	1	2	3	4
21. ¿Se incluyen elementos que faciliten la implicación del profesorado del área de inglés (como alumno del mismo) en su propio proceso de aprendizaje?	1	2	3	4
22. ¿Se adapta el curso a las necesidades del profesorado del área de inglés (como alumno del mismo), favoreciendo un entorno interactivo?	1	2	3	4
23. ¿Presenta el curso vías de comunicación e interacción con el profesorado tutor y con otros usuarios adecuadas y de fácil uso y acceso?	1	2	3	4
SOBRE LA EVALUACIÓN				
24. ¿Se ajusta la evaluación del curso a criterios de objetividad?	1	2	3	4
25. ¿Se utilizan estrategias de evaluación entre iguales (evaluación por pares o *pair assessment*)?	1	2	3	4
26. ¿El alumnado es evaluado por el profesorado del curso en algún momento?	1	2	3	4
27. ¿Las tareas se describen y explican de forma adecuada, permitiendo al alumno saber con claridad qué debe hacer y cómo realizarlas?	1	2	3	4
OBSERVACIONES:				

Conclusiones

Hasta la fecha, la mayoría de este tipo de cursos no responde a las necesidades del perfil del profesorado de L2 en formación, ni proporcionan entornos interactivos para el aprendizaje y la mejora de L2 y su didáctica [9].

A pesar de que pueda criticarse el carácter masivo de estos cursos, consideramos que con una evaluación adecuada de la calidad pedagógica y una mejora de sus debilidades de acuerdo con el instrumento diseñado, los MOOC de contenido lingüístico tienen un gran potencial para el profesorado en formación (y el profesorado en activo que quiera actualizar sus conocimientos o mejorar sus competencias) de lenguas extranjeras.

No cabe duda de que los MOOC han supuesto, y están suponiendo, un avance notable en la formación *on-line*. La presente propuesta, por consiguiente, pretende establecer un punto de partida para la evaluación de este tipo específico de MOOC y, a su vez, tratar de sugerir un punto de unión entre los distintos participantes en la creación, el desarrollo y la evaluación para mejorar su calidad y usabilidad por parte del profesorado de L2 y su didáctica.

Bibliografía

[1] L. Johnson, S. Adams, M. Cummins, V. Estrada, A. Freeman, H. Ludgate (Eds.), NMC Horizon Report: 2013 K-12 Edition, The New Media Consortium, Austin, 2013, p. 44.

[2] M. Vardi, Will MOOCs Destroy Academia? Communications of the ACM (2012), 55(11), 5.

[3] R. Poy, A. Gonzales-Aguilar, Factores de éxito de los MOOC: algunas consideraciones críticas. Revista Ibérica de Sistemas y Tecnologías de Información (2014), SN1, 105-118.

[4] E. Teplechuk, Emergent models of Massive Open Online Courses: an exploration of sustainable practices for MOOC institutions in the context of the launch of MOOCs at the University of Edinburgh [dissertation], University of Edinburgh, 2013.

[5] Scopeo, MOOC: Estado de la situación actual, posibilidades, retos y futuro, Universidad de Salamanca-Centro Internacional de Tecnologías Avanzadas, Salamanca, 2013, p. 266.

[6] E. Vázquez, E. López, J. Sarasola, La expansión del conocimiento en abierto: los MOOC, Octaedro, Barcelona, 2013, p. 120.

[7] M. Ramírez Fernández, Propuesta de certificación de calidad de la oferta española educativa de cursos MOOC realizada por el Instituto Nacional de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado. IJERI (2015), 3, 121-133.

[8] P. Hernández, C. López, E. Heredero, Calidad de un MOOC sobre inclusión educativa: aplicación de varios instrumentos e indicadores. Revista Ibero-Americana de Estudos em Educação (2016), 11(25).

[9] M. Perifanou, A. Economides, (2014). MOOCs for foreign language learning: An effort to explore and evaluate the first practices. Proc. INTED2014, Valencia, 10-12 March 2014, IATED, Valencia, 2014, pp. 8-12.

Ingeniería y Arquitectura

Capítulo 42. Sistema automático para el cálculo de volumen de infarto cerebral a partir de imágenes de resonancia magnética

Julio Camacho Cañamón

Universidad de Córdoba. Escuela Politécnica Superior de Córdoba. Departamento de Informática y Análisis Numérico.

Edificio "Albert Einstein" (C2). Campus de Rabanales. C.P.: 14071, Córdoba. España. E-mail: p92camcj@uco.es

Resumen

Este trabajo pretende resolver un problema existente en el campo de análisis de imágenes médicas para el diagnóstico en modelos animales. A partir de imágenes de resonancia magnética, es necesario calcular el porcentaje de volumen que ocupa una lesión cerebral causada por isquemia respecto al volumen del cerebro. El objetivo de este estudio es automatizar el proceso de cálculo, que actualmente se realiza de forma manual, y reducir el tiempo necesario para ello, además de garantizar la objetividad de los resultados. Aplicando hibridaciones entre algoritmos de visión artificial y de aprendizaje automático, ha sido posible igualar en precisión y mejorar el tiempo de realización de la medida de estos volúmenes respecto al método manual actual. Con esto, se concluye que las sinergias que pueden existir entre distintos campos del conocimiento producen resultados interdisciplinares que permiten el avance de la ciencia con la consecuente repercusión sobre el beneficio social.

Fundamentos

Fue en 1971 cuando Raymond Damadian, un médico estadounidense de origen armenio, científico y profesor del Downstate Medical Center de la State University of New York (SUNY), informó en un artículo de la revista *Science* [1] que los tumores y el tejido sano podían ser distinguidos gracias a la resonancia magnética. Damadian creó en 1972 la primera máquina de imágenes por resonancia magnética, y desde entonces esta técnica de imagen para el diagnóstico no ha dejado de evolucionar y mejorar.

La imagen por resonancia magnética es una de las técnicas de neuroimagen más versátiles que existen en la actualidad. Existen equipos, diseñados específicamente para animales pequeños, que permiten trabajar con magnitudes elevadas de un campo magnético en comparación con los sistemas de imagen clínicos convencionales aptos para seres humanos. Por ello, es posible realizar estudios de imagen molecular para lograr un contraste inmuno-específico *in vivo* en roedores. Son estas imágenes las que se utilizan para analizar y medir manualmente el porcentaje volumétrico de lesión en relación con el cerebro de los roedores.

Actualmente, los investigadores producen una isquemia que causa una lesión cerebral en los roedores. A partir de estos animales lesionados, tras someterlos a resonancia magnética, se obtiene un conjunto de imágenes que son procesadas y analizadas manualmente utilizando el software ImageJ [2], desarrollado en Java.

A partir de la primera selección se procesan y analizan los demás cortes horizontales para, finalmente, obtener el volumen del cerebro del roedor y el volumen de materia lesionada, y así calcular el porcentaje volumétrico de cerebro que se ha lesionado tras la isquemia.

Este proceso, además de tener una duración de aproximadamente dos horas de trabajo, es tedioso y poco preciso ya que depende del criterio subjetivo del investigador que haga la selección y el recorte. Es aquí donde nace la necesidad de una solución computacional que realice de forma automática, óptima y objetiva esta tarea.

Metodología

En primer lugar, dada una imagen de un mapa cerebral formado por 14 cortes axiales, con una separación de un píxel entre cada uno, dispuestos en una matriz de 14×1 es necesario dividir la imagen en cada uno de los cortes y almacenarlos de forma ordenada. A cada imagen de corte axial se le denomina sección. Un mapa, por lo tanto, está formado por un vector ordenado de secciones. Cada elemento del vector es una sección de la imagen que representa el cerebro.

Para cada sección se debe calcular cuál será la región de la imagen que representa al cerebro. Para ellos se aplicará una hibridación de métodos propios de la segmentación de imágenes: algoritmo de detección de bordes de Canny [3] y algoritmos de modelado de contornos activos sin bordes [4].

Una vez obtenida la segmentación del cerebro de cada sección del mapa, es el momento de comenzar con la segmentación de la lesión. Se aplicará en primer lugar un algoritmo de agrupación como *k-means* [5] para la localización de la lesión en el cerebro. Como la imagen de partida del algoritmo *k-means* será un cerebro ya lesionado, solamente se podría encontrar dos tipos de materias: cerebro sano y cerebro lesionado; por tanto, se establece $k=2$. Las características o atributos que se reflejarán de cada punto son: la intensidad lumínica del píxel, y la posición en el eje horizontal en la que se encuentra el píxel. Estas características serán normalizadas para que siempre se encuentren entre los valores [0, 1], y posteriormente serán

ponderadas con los parámetros β y 1-β para la intensidad lumínica y la posición en el eje horizontal, respectivamente.

Para una segmentación de la lesión perfilada y definitiva, se aplicará el mismo algoritmo que se utilizó para la mejora de la segmentación del cerebro, un modelado mediante contornos activos sin bordes.

El resultado de cada algoritmo de segmentación es una matriz binaria para cada sección del mapa, donde se indican los píxeles que pertenecen al cerebro y a la lesión, respectivamente.

Conociendo las características de las imágenes de resonancia magnética, si se calcula el área de la segmentación de una sección, se obtiene a su vez el volumen de la segmentación. Por lo tanto, calculando el área de las segmentaciones del cerebro para cada sección y sumándolas entre sí, se obtiene el volumen cerebral. De igual forma para la segmentación de la lesión.

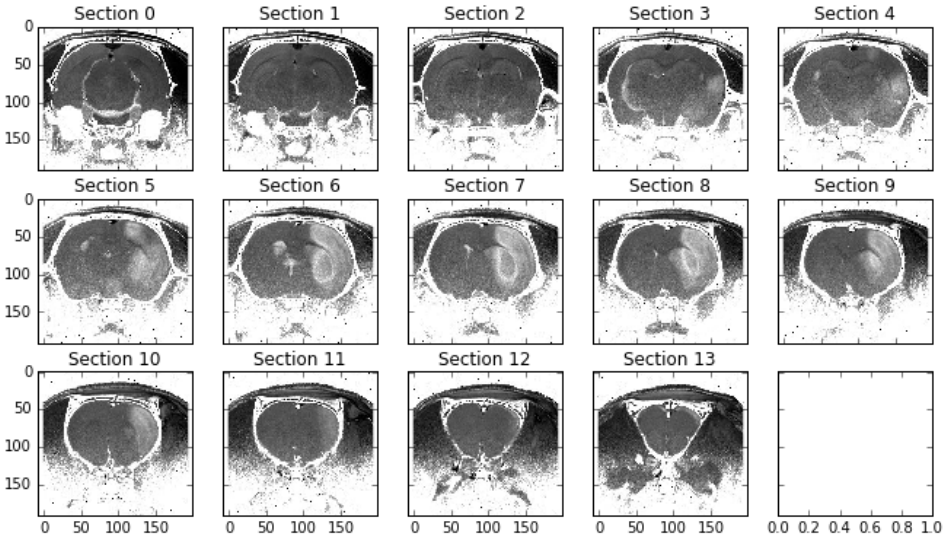
Obtener el área de una segmentación es tan simple como contabilizar el número de píxeles que forman parte de esa segmentación. Para ello se deben sumar todos los elementos de cada matriz de segmentación, ya que al ser binaria, daría como resultado el número total de píxeles que forman parte de dicha segmentación. Tras hacer esa sencilla operación matemática, se debería multiplicar por la resolución de las imágenes (que es de 0.1 mm/píxel).

De esta forma se obtiene el volumen de cerebro y de lesión de un modelo animal. Si se realiza el cociente del segundo entre el primero, se obtiene el porcentaje volumétrico de lesión frente a cerebro, que es la finalidad de este trabajo.

Resultados

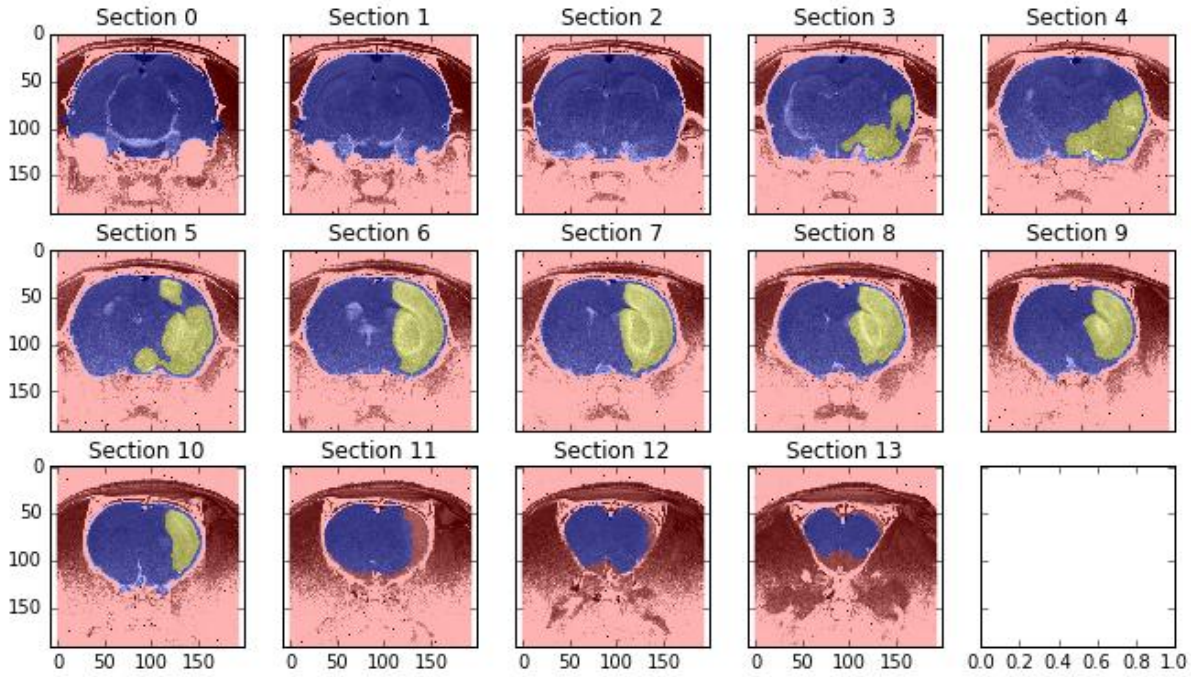
En la tabla 1 se pueden apreciar los mapas cerebrales de tres modelos animales y, en la tabla 2, el resultado de la segmentación tanto del cerebro como de la lesión cerebral.

Tabla 1. Mapa cerebral dividido en catorce secciones.



Con el fin de facilitar al lector el reconocimiento de la segmentación resultante (véase tabla 2), se han aplicado las siguientes máscaras binarias traslúcidas: una máscara de color azulado para la región cerebral, una máscara de color amarillento para la región de la lesión y una máscara de color rojizo para lo que ha sido considerado como el fondo de la imagen.

Tabla 2. Resultado de la segmentación para cada sección.



Conclusiones

Sobre la base de los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El conjunto de algoritmos híbridos que se ejecutan en el sistema tienen un rendimiento óptimo, en lo que a precisión se refiere.
- El sistema es más rápido, tanto para la segmentación como para la medición, en comparación a un investigador humano.

Bibliografía

[1] Damadian, Raymond. "Tumor detection by nuclear magnetic resonance." 171 (1971): 1151-1153.

[2] Abràmoff, Michael D, Paulo J Magalhães, and Sunanda J Ram. "Image processing with ImageJ." *Biophotonics international* 11.7 (2004): 36-42.

[3] Canny, John. "A computational approach to edge detection." *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence* 6 (1986): 679-698.

[4] Marquez-Neila, Pablo, Luis Baumela, and Luis Alvarez. "A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces." *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 36.1 (2014): 2-17.

[5] Hartigan, John A, and Manchek A Wong. "Algorithm AS 136: A k-means clustering algorithm." *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* 28.1 (1979): 100-108.

Capítulo 43. Clustering de Series Temporales basado en la Extracción de Tipologías de Segmentos

David Guijo-Rubio, Antonio Manuel Durán-Rosal, Pedro Antonio Gutiérrez-Peña, César Hervás-Martínez.

Universidad de Córdoba. Escuela Politécnica Superior. Departamento de Informática y Análisis Numérico.

Campus de Rabanales, edificio Albert Einstein, 3ª Planta, Ala Norte, Laboratorio del grupo de investigación AYRNA, CP: 14071. E-mail: i22gurud@uco.es

Resumen

Durante los últimos años se ha producido un gran aumento de series de datos distribuidas a lo largo del tiempo, o lo que es lo mismo, de series temporales. Este crecimiento ha traído consigo un interés en su agrupamiento o *clustering*, proceso de agrupar las series de forma que, las series de un mismo grupo sean muy similares entre sí y muy diferentes a las de otros grupos. Cuando las series temporales son muy largas, presentan ruido o valores perdidos, muchos de los métodos actuales obtienen soluciones que no son aceptables. En este artículo se presenta un nuevo método de *clustering* para series temporales, mediante polinomios utilizando un método conocido como *Growing Window*. De esta forma simplificamos la serie a un conjunto de coeficientes lineales de grado variable, para, posteriormente, agrupar los diferentes segmentos y hallar los centroides de cada *cluster*. Al final la serie queda simplificada a *n* x *d* elementos, siendo *n* el número de *clusters* y *d* el grado del polinomio utilizado en la aproximación y es con esta representación con la que se realiza la agrupación final. El objetivo de esta nueva metodología consiste en disminuir la dimensionalidad de la serie temporal, la sensibilidad del agrupamiento y los datos perdidos.

Fundamento

En esta sección se describirá en profundidad el concepto de *clustering* de series temporales. Consiste en la agrupación de datos distribuidos a lo largo del tiempo, de forma que, las series temporales pertenecientes al mismo *cluster* sean lo más similares posibles y las series temporales de diferentes *clusters* sean lo más diferentes entre sí. En la Figura 1 se muestra el *clustering* de varias series temporales en dos *clusters*:

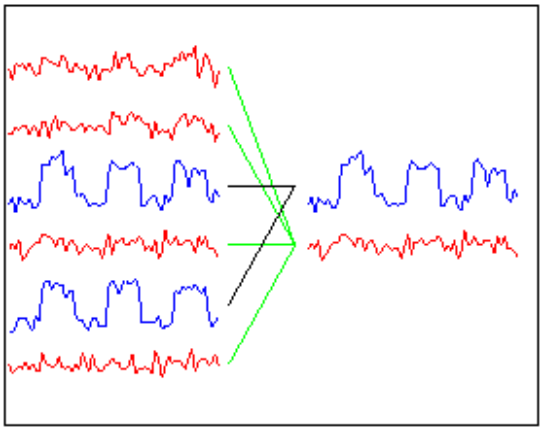


Figura 1. Ejemplo de clustering de series temporales.

Hay muchos tipos de *clustering* que se pueden aplicar a diversas situaciones. El *clustering* se puede aplicar sobre diferentes formas de series temporales, dos principalmente [1, 2], el primer tipo está formado por el c*lustering* de series temporales completas, cuyo objetivo es agrupar diversas series temporales independientes. El otro tipo está formado por el c*lustering* de segmentos de series temporales que consiste en agrupar distintos segmentos extraídos de una sola serie temporal.

El objetivo de este artículo es el agrupamiento de series temporales completas. El *clustering* puede presentar distintos problemas: las series podrían tener distinto tamaño, presentar valores perdidos, ruido, etc. Con el fin de subsanar estos problemas, se ha implementado un nuevo método, que se explicará en la metodología, consistente en simplificar cada serie temporal en vectores de pequeña longitud.

El trabajo existente sobre *clustering* de series temporales se puede dividir en dos grupos, el primero consiste en hacer *clustering* sobre series temporales completas y el segundo está formado por aquellos casos donde se aplica algún método de reducción de dimensionalidad antes de realizar el *clustering* [3, 4].

Los dos tipos de *clustering* más utilizados en series temporales son el *clustering* jerárquico y el particional, cuyos algoritmos más utilizados son el aglomerativo y el *k-means* respectivamente. Aparte de la distancia euclídea, la más utilizada, existen diferentes medidas de distancia para las series temporales como son la *Dinamic Time Warping* (DTW) o la medida *Swale*, que incorporan ventajas como que las dos series puedan tener distinta longitud.

Metodología

Nuestro método está compuesto por dos partes. La primera etapa está formada por la segmentación de cada serie temporal [5] consistente en cortar la serie en algunos puntos específicos, intentando conseguir diferentes objetivos. La segmentación se puede realizar de

varias formas. En nuestro caso, con el algoritmo *Growing Window* [6] la segmentación se realiza por medio de una ventana deslizante de tamaño creciente, inicialmente formada por tres puntos consecutivos de la serie temporal. El punto de corte para determinar cada segmento de la serie se realiza dependiendo de un error de aproximación. Cada vez que se añade un nuevo punto, se realiza una aproximación por medio de un polinomio de grado variable, en nuestro caso de grado dos, y posteriormente se calcula su error de aproximación. Si este error supera un cierto umbral entonces se corta el segmento en el punto anterior de la serie. De lo contrario, se añade otro punto al segmento actual. La segmentación acaba cuando se ha alcanzado el final de la serie temporal. El error de aproximación utilizado en nuestro caso es el *Squared Error Percentage* (SEP) y se muestra en la Fórmula 1:

$$SEP = \frac{\sqrt{MSE}}{|\bar{y}|} * 100 \quad (1) \qquad MSE = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(\hat{y}_i - y_i)^2 \quad (2)$$

siendo $\bar{y}$ el valor medio de los puntos del segmento y el *MSE* el error cuadrático medio definido en la Fórmula 2 donde n es el número de observaciones, $\hat{y}_i$ es el valor i-ésimo aproximado e $y_i$el real.

La ventaja de utilizar esta medida de error es que es adimensional, permitiendo especificar porcentajes de error en vez de establecer errores específicos para cada serie temporal.

Una vez realizada la segmentación de la serie, el método continúa con el proceso de *clustering* consistente en agrupar los distintos segmentos obtenidos en el paso anterior y una simplificación de cada serie calculando de los centroides de los segmentos. La siguiente etapa del algoritmo está comprendida por el *clustering* de todas las series simplificadas, es decir, los centroides. Finalmente, el algoritmo devuelve la agrupación de las series temporales.

Resultados

El método desarrollado se ha ejecutado sobre las siguientes bases de datos, cada una con tres clases [7]: *RefrigerationDevices*, la cual está formada por 750 series temporales de longitud 720, *ScreenType*, formada por 750 series temporales de longitud 720, *CBF*, formada por 885 series temporales de longitud 128, *ChlorineConcentration*, formada por 2655 series temporales de longitud 166 y por último, *StarLigthCurves* que está formada por 3450 series temporales de longitud 1024. A cada una de estas bases de datos se les ha eliminado la etiqueta para realizar el clustering, y luego se ha utilizado dicha etiqueta para validarlo.

Se ha ejecutado el método sobre todos los conjuntos de datos con un valor del umbral de error SEP igual a 250 %. El número de *clusters* para agrupar los segmentos es dos y el número de *clusters* para agrupar la simplificación realizada de las series temporales es igual al número de clases del conjunto de datos, en este caso es tres para todos los conjuntos de datos.

Una vez ejecutado nuestro método (*Clustering* basado en Tipologías de Segmentos, abreviado cómo CTS), se ha medido el número de instancias correctamente clasificadas (CCR), la pureza del *clustering*, la entropía [8] y el tiempo necesario para ejecutar el algoritmo, para ver la calidad de los resultados obtenidos. Se han comparado estos resultados frente al *clustering* punto a punto (PAP) y los resultados son los que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 1. Resultados obtenidos.

Conjunto de datos	% CCR (↑)		Entropía (↓)		Pureza (↑)		Tiempo (↓)	
	PAP	CTS	PAP	CTS	PAP	CTS	PAP	CTS
Refrigeration	35,600	**76,000**	1,566	**0,837**	0,356	**0,760**	**1,063**	314,190

ScreenType	40,000	**58,667**	1,554	**1,239**	0,406	**0,587**	**1,825**	302,130
CBF	52,429	**63,728**	**1,165**	1,203	0,584	**0,637**	**0,274**	64,828
ChlorineConcentration	34,086	**40,264**	1,584	**1,537**	0,340	**0,403**	**1,475**	248,220
StarLigthCurves	75,855	**88,550**	0,626	**0,480**	0,758	**0,886**	**12,197**	1881,700

Conclusiones

En este artículo se ha propuesto un nuevo algoritmo de *clustering* de series temporales, consistente en el *clustering* de una versión simplificada de las mismas obtenida mediante una primera fase de segmentación. El algoritmo ha sido probado en distintas bases de datos de tipo *benchmark,* y los resultados obtenidos mejoran a los de la metodología tradicional punto a punto en términos de CCR, Entropía y Pureza. El tiempo que tarda el algoritmo en realizar todo el proceso es superior a la metodología tradicional, pero la parte invertida en realizar el agrupamiento tras la simplificación es mucho menor.

Como futura mejora se estudiará la posibilidad de paralelizar la parte de simplificación de series (segmentación), con el fin de reducir exponencialmente el cómputo total del algoritmo.

Bibliografía

[1] S. Aghaborzorgi, A. S. Shirkhorshidi, T. Y. Wah. Time Series Clustering – A decade review. *Information Systems,* 53 (2015) 16-38.
[2] T. Warren Liao. Clustering of time series data. *Pattern Recognition*, 38 (2005) 1857-1894.
[3] X. Wang, K. Smith, R. Hyndman. Characteristic-Based Clustering for Time Series Data. *Data Mining and Knowledge Discovery*, 13 (2006) 335-364.
[4] Y. Xiong, D. Yeung. Time Series Clustering with ARMA Mixtures. *Pattern Recognition*, 37 (2004) 1675-1689.
[5] T. Fu. A review on time series data mining. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 24 (2011) 164-181.
[6] E. Fuchs, T. Gruber, J. Nitschke, B. Sick. Online Segmentation of Time Series Based on Polynomial Least-Squares Approximations. *Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 12 (2010) vol. 32 2232-2245.
[7] Y. Chen, E. Keogh, B. Hu, N. Begum, A. Bagnall, A. Mueen, G. Batista. *The UCR Time Series Classification Archive*. www.cs.ucr.edu/~eamonn/time_series_data/ (2015).
[8] E. Amigó, J. Gonzalo, J. Artiles, F. Verdejo. A comparison of extrinsic clustering evaluation metrics based on formal constraints. *Information Retrieval*, 12 (2009) 461.

Capítulo 44. Emulador de planta eólica basado en un generador eléctrico de inducción con doble alimentación (DFIG)

Manuel Lara Ortiz

Universidad de Córdoba. Escuela Politécnica Superior de Córdoba. Departamento de Informática y Análisis Numérico.

Campus de Rabanales, Edificio Leonardo Da Vinci, Córdoba, España. E-mail: p12laorm@uco.es

Resumen

Este documento presenta la descripción del trabajo desarrollado sobre una planta de laboratorio con el fin de emular el funcionamiento de un aerogenerador de velocidad variable. La planta se basa en un generador eléctrico de inducción con doble alimentación (DFIG) de pequeña potencia, cuyo eje de rotación es solidario con un servomotor brushless de corriente continua que actúa de motor de arrastre. En este trabajo se desarrolla toda una capa software adicional que permite emular sobre el servomotor de arrastre toda la componente aerodinámica de la que carece la planta experimental. Además se muestran unos primeros resultados del estudio de aplicación de un sistema de control de la velocidad de rotación.

Fundamento

A día de hoy, la energía eólica se ha convertido en la tecnología de generación eléctrica renovable más prometedora. A nivel nacional, la energía procedente por parte del viento supone un 19,54% de la cobertura energía actual, situándose incluso por delante de energías tradicionales como el carbón [1].

Considerando este prometedor futuro para la energía eólica, el estudio del proceso resulta necesario para seguir avanzado en la optimización y mejora de su rendimiento. Sin embargo, dada la envergadura de las instalaciones eólicas y de la imposibilidad de reproducir la fuente de energía (el viento) es necesario recurrir a emuladores [2]. En los últimos años, ha habido un avance importante en el desarrollo de emuladores eólicos [3], utilizando herramientas de simulación para reproducir parte de las dinámicas del sistema completo, generalmente las más difíciles de reproducir en el laboratorio como son el viento y el comportamiento aerolástico-mecánico del propio aerogenerador. En este trabajo se ha utilizado uno de estos sistemas, en el que el generador eléctrico es real (aunque de pequeña potencia), una máquina de inducción con doble alimentación (Doubly-Fed Induction Generator, DFIG). Conectado a este generador se dispone de un motor de arrastre controlado desde un ordenador, de forma que desde el mismo se puede reproducir un viento predefinido, se pueden elegir características aerolásticas de las aspas así como el comportamiento de góndola, estructuras y mecanismos de transmisión del movimiento. Todas estas herramientas se han añadido en el entorno Matlab/Simulink. Esta capa software alberga todo el modelado matemático de la parte aerodinámica y el mecanismo de transmisión y permite emular la característica del coeficiente de potencia, las curvas que representan la potencia que el aerogenerador es capaz de extraer del viento en función de sus características. Esta capa, además, dota de versatilidad a la planta al poder parametrizar el modelo matemático con diferentes valores.

El objetivo de la planta es que sirva de banco de pruebas realista para estudio de diferentes metodologías de control y optimización sobre diferentes escenarios de aerogenerador. Para ello la planta también dispone de un completo sistema de monitorización (un SCADA).

Metodología

A partir del sistema emulado comentado en el apartado anterior, se pasa a describir de manera escueta las etapas en las que se ha dividido el trabajo realizado a lo largo del transcurso de la beca cursada.

Para emular las condiciones de viento se utilizan dos funciones .m obtenidas de [4], en la que el viento es emulado por la superposición de cinco componentes: valor promedio, una componente rampa, una componente de ráfaga, una componente de ruido o turbulencia y una componente sinusoidal.

Para emular las condiciones aerodinámicas se ha tenido en cuenta ciertos parámetros del aerogenerador emulados, como pueden ser el radio del rotor, el ángulo de paso de pala, la velocidad del viento, etc, además de conceptos fundamentalmente aerodinámicos como el límite de Betz [5], coeficiente de velocidad específica [6], y curvas de superficie del coeficiente de potencia Cp desarrolladas en [7] y Figura 1.

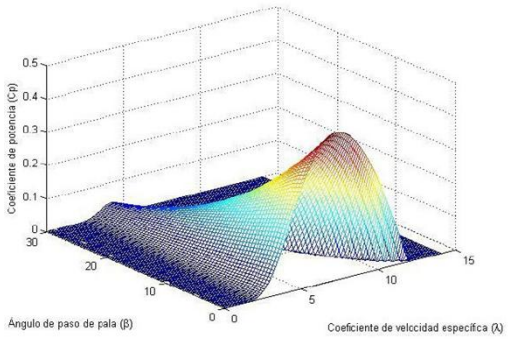


Figura 1. Curvas de superficie de los coeficientes de potencia Cp frente a λ y β

Para emular las condiciones mecánicas se ha tenido en cuenta el modelo matemático del mecanismo de rotación tomando como referencia algunos modelos reportados en la literatura [8], simplificando el modelo inicial de dos masas a un modelo de una masa más simple.

Para el diseño de un controlador en Simulink se establece un control de velocidad angular rotórica en la región nominal manipulando el ángulo de paso de pala virtual. Previo al diseño e implementación del controlador se establece un análisis e identificación de la dinámica de la velocidad rotórica frente a cambios en el ángulo de paso de pala observando que el modelo presenta una ganancia distinta para diferentes puntos de operación de pitch y presenta una ganancia y constante de tiempo diferente para distintas velocidades de viento.

El diseño del controlador se hace para operar dentro de la zona a plena carga para velocidades de viento superiores a los 12.18 m/s (viento nominal). Se diseña a través de un modelo de la planta que sea una solución intermedia de entre los modelos con dinámicas de primer orden obtenidos para los distintos pitch y velocidades de viento. Cuando se dice una solución intermedia, se refiere a un modelo con valores de ganancia y constante de tiempo intermedios de entre todos los obtenidos y que pueda servir para todo tipo de vientos.

Para el diseño del sistema basado en PC sin alterar la red de comunicación original de la planta se resuelven los siguientes obstáculos: para comunicar Simulink con la planta se utiliza el entorno de comunicación OPC de Simulink (OPC Toolbox) y para permitir que el SCADA actual siga operativo se utiliza una pasarela de comunicación.

Resultados

Se obtienen resultados de la respuesta del controlador frente a dos perfiles de velocidad de viento extremos diferentes, dentro de la región de operación nominal.

El primero de ellos es un patrón de viento cambiante con diferentes saltos escalón bruscos que oscilan entre 12,18 m/s y 25 m/s. El segundo perfil de viento es un viento aleatorio comprendido entre los 12,18 m/s y los 25 m/s. La Figura 2 representa la respuesta del sistema frente a este tipo de viento.

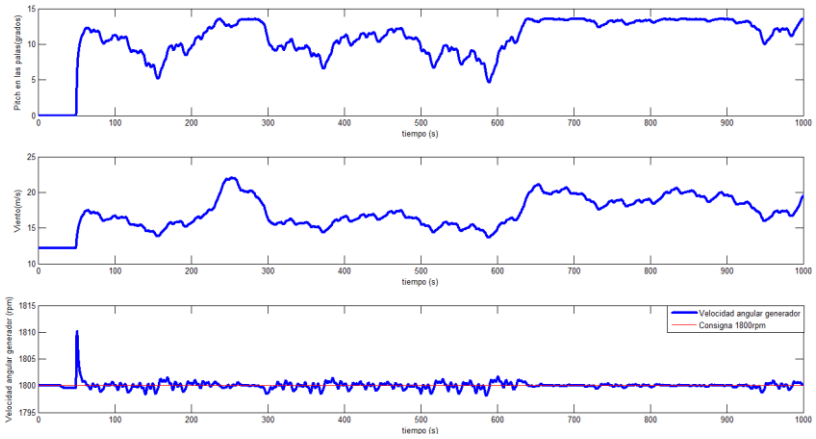


Figura 2. Comportamiento ante viento cambiante.

Se observa en ambos ensayos cómo el controlador diseñado es capaz de manipular el ángulo de paso de pala para poder rechazar las fuertes perturbaciones del viento generadas. También se observa que la velocidad del generador presenta una desviación pequeña con respecto a la referencia a lo largo de los ensayos. Este es un hecho de carácter importante en la región de operación nominal, puesto que se reduce el posible riesgo de sobrecarga y fatiga estructural de las componentes mecánicas del sistema.

Conclusiones

Se ha puesto a punto una planta sobre la que se ha comprobado el correcto funcionamiento de la parte aerodinámica y mecánica emulada, mejorando en gran modo el potencial de simulación con respecto al sistema real.

Desde una perspectiva académica este proyecto ha permitido profundizar al autor en diversos aspectos estudiados en el Grado de Electrónica, Máster en Ingeniería Industrial y aprender otros que no se conocían. Además, le ha permitido integrarse en un proyecto de investigación aprendiendo a buscar información de distintas fuentes bibliográficas, artículos científicos, etc, mejorar el dominio del idioma (lectura de textos en inglés) y relacionarse con doctores y futuros doctorandos, conociendo más a fondo el mundo investigador en la Universidad.

Desde una perspectiva profesional, durante la ejecución de este trabajo se han establecido relaciones con la empresa De Lorenzo S.p.A y sus ingenieros, teniendo dicho autor contacto directo con ellos a través de diversas videoconferencias incluso recibiendo una visita de dos días de duración en el laboratorio donde se encuentra la planta.

Bibliografía

[1] Asociación Empresarial Eólica La Voz del Sector, AEE 2016.
[2] J. Vaheeshan, V. Vihirthanath, S. G. Abeyaratne, A. Atputharajah, G. Ramatharan, Wind Turbine Emulator 2011.
[3] Fernando Martinez, L. Carlos Herrero, Santiago de Pablo, Open loop wind turbine emulator 2014.
[4] Masoud Barakati, Thesis PhD “Modeling and Controller Design of a Wind Energy Conversion System Including a Matrix Converter”. University of Waterloo, Ontario, Canada. 2008.
[5] M. González, F. Vázquez, and F. Morilla, "Control Multivariable Centralizado con

Desacoplo para Aerogeneradores de Velocidad Variable," Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial, vol. 7, pp. 53-64. 2010.
[6] F. Bianchi, H. D. Battista, and R. Mantz, Wind Turbine Control Systems Principles, Modelling and Gain Scheduling Design. Germany: Springer. 2007.
[7] M. J. Khan and M. T. Iqbal, "Analysis of a small wind-hydrogen stand-alone hybrid energy system," Applied Energy, Elsevier, vol. 86, pp. 2429-2442. 2009.
[8] B. Boukhezzar, L. Lupu, H. Siguerdidjane, and M. Hand, "Multivariable Control Strategy for Variable Speed, Variable Pitch Wind Turbine," Renewable Energy, Science Direct Elsevier, vol. 32, pp. 1273-1287. 200.

Capítulo 45. Patrones temporales de los coeficientes de escorrentía volumétricos en cuencas forestales de Puerto Rico

J.I. Migallón, E.V. Taguas, Y.Yuan

Universidad de Córdoba. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes. Departamento de Ingeniería Rural.

Edificio Leonardo Da Vinci. Campus de Rabanales. Carretera Nacional IV, Km. 396. 14014 Córdoba. E-mail: migallon_forestal@outlook.com

Resumen

El análisis de las relaciones lluvia-escorrentía resulta fundamental en la planificación hidrológica de cuencas, particularmente en áreas afectadas por huracanes como es el caso de Puerto Rico, donde periódicamente éstos provocan inundaciones y arrastres de sedimentos y contaminantes que alteran los ecosistemas riparios. Los objetivos principales de este estudio abordaron la caracterización de los coeficientes de escorrentía volumétricos a escala anual y mensual así como el modelado estadístico de las relaciones lluvia-escorrentía en 19 cuencas fundamentalmente forestales donde se han recopilado y analizado sus principales atributos físicos-hidrológicos y series lluvia-escorrentía en períodos superiores a 10 años. Los resultados proporcionaron un valor de coeficiente de escorrentía medio mensual igual a 0.43 (±0.15) y a escala anual de 0.37 (±0.20). Ni el área de la cuenca ni la precipitación anual explicaron la alta variabilidad observada en las distribuciones mensuales y anuales de los coeficientes de escorrentía. Por otro lado, se han ajustado dos modelos de regresión lineal para predecir a escala anual y mensual los valores de escorrentía en cuencas tropicales. Este resultado permite a los gestores entender con mayor precisión el balance de agua en sus cuencas y apoyar la toma de decisiones en las medidas de las aportaciones hídricas.

Fundamento

La estimación precisa de los volúmenes de escorrentía y los caudales máximos son imprescindibles en hidrología para el diseño y dimensionamiento de estructuras de reserva y/o de evacuación de avenidas [1], así como para los estudios basados en la simulación de escenarios derivados de cambios de uso del suelo [2] o análisis temporales, como puede ser el modelado de situaciones asociadas al cambio climático [3].

Existen distintas metodologías para la estimación de la respuesta de la cuenca o escorrentía [4]. Se conoce que el valor del coeficiente de escorrentía depende fuertemente del uso del suelo [5] por lo que se puede valorar en una zona a partir de coeficientes de escorrentía basados en la literatura y en función de la composición de clases de uso del suelo [6]. Por otro lado la interpretación del coeficiente de escorrentía en el ámbito de la planificación hidrológica se asocia también al cociente entre los volúmenes de precipitación y escorrentía en una escala temporal dada [6].

Como consecuencia de la importancia que supone el conocimiento del balance del agua en una cuenca y sus efectos sobre los ecosistemas y gestión de recursos hídricos los objetivos de este trabajo fueron: i) la caracterización de los coeficientes de escorrentía volumétricos a escala anual y mensual para evaluar su variabilidad y posible dependencia con atributos físicos de las cuencas; ii) la exploración y modelado de los patrones lluvia-escorrentía en las cuencas de estudio.

Metodología

El estudio se ha acometido en Puerto Rico, para 19 cuencas forestales y aforadas para distintos períodos de registro de caudales. De acuerdo al **primer objetivo** de caracterización de los coeficientes de escorrentía y su posible relación con atributos físicos de las cuencas se realizaron las siguientes tareas:

- Recopilación y análisis de los atributos físicos de las cuencas, en particular, área de desagüe, pendiente media, longitud del canal, pendiente del canal, precipitación anual, fracciones de usos de suelo, evaluación de tipos de suelos y sus características de infiltración.

- Recopilación y análisis de las series de datos de lluvia y escorrentía en 19 cuencas forestales donde la lluvia media espacial se determinó a través de la metodología de los polígonos de Thiessen. Además se cruzaron los datos de lluvia-escorrentía para los mismos períodos de tiempo y se realizó un análisis preliminar de la consistencia de los datos.

- Cálculo de estadísticos básicos (medios, mediana, percentil 10 y percentil 90) e histogramas de los coeficientes de escorrentía volumétricos en las cuencas de estudio.

El tratamiento cartográfico de los datos se realizó a partir de ARCGIS 10 mientras que la estadística fue realizada con STATISTICA 8.

De acuerdo al **segundo objetivo**, se evaluó de forma individual las relaciones lluvias-escorrentía tanto en términos de pendiente del ajuste como de coeficientes de determinación. Además, a partir del análisis se procedió al ajuste de un modelo empírico lineal de cálculo del volumen de escorrentía a escala mensual y anual a partir de valores de lluvia en las cuencas.

Resultados

En relación al **primer objetivo**, a pesar de trabajar en cuencas forestales con un porcentaje de superficie de bosque perenne muy similar, la respuesta de las cuencas para diferentes escalas temporales fue muy variable. Tampoco el área de desagüe y la precipitación anual pudieron explicar la variabilidad de los coeficientes de escorrentía en las cuencas.

El coeficiente de escorrentía medio mensual en las cuencas fue de 0.43, con un rango de variación entre 0.24 - 0.79. La mediana mensual y la desviación típica de la serie fueron, 0.43 y 0.15 respectivamente. A escala anual, la media fue de 0.37 con un mínimo de 0.25 y un máximo de 0.49, mientras que la mediana y la desviación típica fueron 0.35 y 0.09 respectivamente. Se observaron diferencias entre los coeficientes de escorrentía recopilados en la literatura y los obtenidos mediante la media de los ratios de pares ordenados lluvia-escorrentía [6].

En relación al **segundo objetivo**, se evaluaron tres grupos de cuencas de acuerdo a la varianza explicada por el ajuste lineal lluvia-escorrentía (*R-F*; F=a*R+b) a las escalas mensual y anual. Así a escala mensual 16 cuencas mostraron un coeficiente de determinación (R^2) mayor de 0.60, 2 cuencas entre 0.40<R^2<0.60 y 1 cuenca con R^2 < 0.40. En el caso de la escala anual, 6 cuencas presentaron un ajuste lineal significativo (R^2>0.60) y 2 un ajuste poco representativo (R^2<0.40). En relación a las pendientes del ajuste *R-F*, tuvo un rango de variación entre 0.27 - 0.86 y 0.22 - 0.78 para la escala mensual y anual respectivamente [5,7].

Finalmente, tras el análisis anterior se ajustaron unas ecuaciones empíricas dependientes de la lluvia y escorrentía que pueden ser útiles en cuencas no aforadas y que se muestran en las Figs. 1-2. Hay que destacar que en el caso de la escala anual, cuando se incluyeron estaciones externas a la divisoria de la cuenca para el cálculo de la lluvia media espacial, la varianza explicada se redujo al 54%. En las Figs. 1 y 2, por consiguiente, sólo se presentan los valores para las cuencas con estaciones pluviométricas localizadas dentro del área de las mismas.

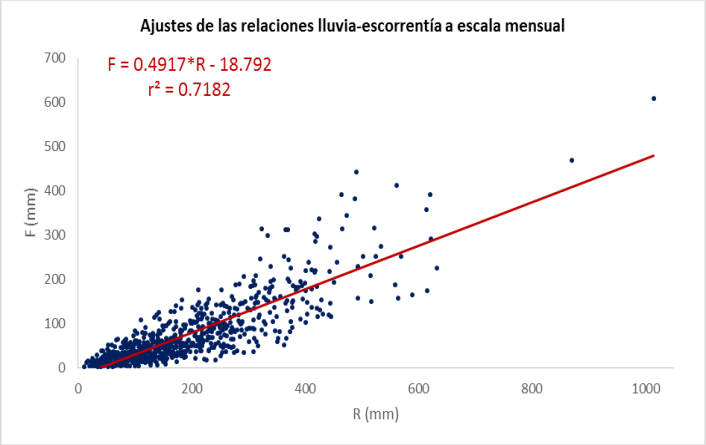


Figura 1. F: escorrentía (mm); R: precipitación (mm); r^2: coeficiente de determinación del ajuste.

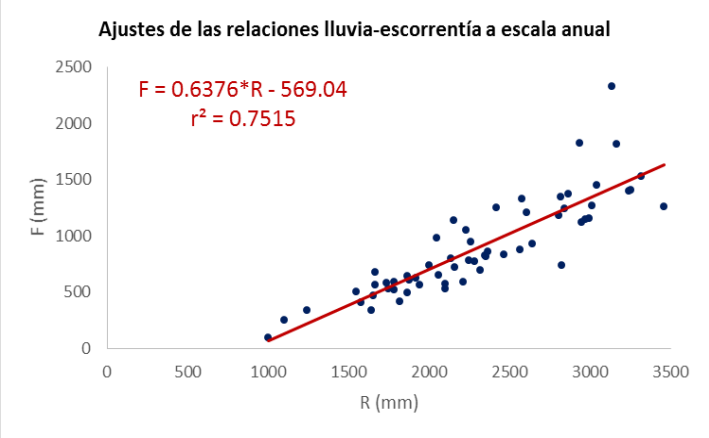


Figura 2. F: escorrentía (mm); R: precipitación (mm); r^2: coeficiente de determinación del ajuste.

Conclusiones

En el presente estudio realizado en 19 cuencas forestales de Puerto Rico se determinó un valor de coeficiente de escorrentía medio a escala mensual de 0.43 y a escala anual de 0.37. El rango de variación de los valores medios en las cuencas fue del 0.24 a 0.79 a escala mensual y de 0.25 a 0.49 a escala anual lo que ilustra su elevada variabilidad.

En 18 de las 19 cuencas estudiadas, las relaciones lineales lluvia-escorrentía a escala mensual fueron aceptablemente significativas mientras que a escala anual de 10 cuencas, 8 fueron aceptablemente representadas por la lluvia. Finalmente, la lluvia a escala mensual y anual fue suficiente para modelar aceptablemente la escorrentía mensual y anual en las cuencas. Los ajustes obtenidos explicaron más del 70% de la variabilidad de la escorrentía pero se aconseja que para el cálculo de la lluvia media espacial, las series de datos de lluvia procedan de estaciones incluidas en las divisorias de las cuencas.

Bibliografía

[1] Muñoz-Carpena, R., Ritter-Rodríguez, A., 2005. Escorrentía Superficial, en: Hidrología Agroforestal. Mundi-Prensa, Madrid, 2005, p. 201–218.

[2] Buendia, C., Bussi, G., Tuset, J., Vericat, D., Sabater, S., Palau, A., Batalla, R.J., 2016. Effects of afforestation on runoff and sediment load in an upland Mediterranean catchment. Sci. Total Environ. 540, p. 144–157.

[3] Montenegro, S., Ragab, R., 2012. Impact of possible climate and land use changes in the semi arid regions: A case study from North Eastern Brazil. J. Hydrol. 434-435, p. 55–68.

[4] Chow, V.T., Maidment, D.R., Mays, L.W., 1988. Applied Hydrology, MCGraw Hil. Nueva York.

[5] Nunes, A., 2015. Recursos Hídricos Na Bacia Do Rio Sabor : Evolução Recente E Relações Com Mudanças Sócio-Ambientais.

[6] Dhakal, N., Fang, X., Cleveland, T.G., Thompson, D.B., Asquith, W.H., Marzen, L.J., 2012. Estimation of Volumetric Runoff Coefficients for Texas Watersheds Using Land-Use and Rainfall-Runoff Data. J. Irrig. Drain. Eng. 138, p. 43–54.

[7] Ceballos-Barbancho, A., Morán-Tejeda, E., Luengo-Ugidos, M.Á., Llorente-Pinto, J.M., 2008. Water resources and environmental change in a Mediterranean environment: The south-west sector of the Duero river basin (Spain). J. Hydrol. 351, p. 126–138.

Capítulo 46. Análisis de la estructura y regeneración del pinar de *Pinus nigra* subsp. Salzmannii en Puerto Llano, Sierra de Cazorla (Jaén)

Pedro José Pérez Moreno

Coautora: Begoña Abellanas Oar

Universidad de Córdoba. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes. Departamento de Ingeniería Forestal.

Campus de Rabanales. Edificio Leonardo Da Vinci. Ctra. Madrid, Km 396.14071 Córdoba. E-mail: o22pemop@uco.es

Resumen

El estudio se centra en el análisis de la estructura de la masa adulta de un pinar natural de pino salgareño (*Pinus nigra* subsp. Salzmanii) en la Sierra de Cazorla y en la investigación de las relaciones espaciales entre el estrato arbóreo adulto y los estratos leñosos que comparten el espacio con él y que intervienen en la dinámica del sistema: el matorral y el regenerado.

El análisis dasométrico de la masa adulta de pinar ha permitido detectar una estructura con mezcla irregular de clases de edad que indica una tasa adecuada de incorporaciones en el pasado, aun cuando la cobertura del pinar no es elevada.

El análisis espacial ha permitido detectar una relación dominante de atracción entre el estrato arbóreo y el regenerado, existiendo una mayor presencia de regenerado en las proximidades del arbolado adulto que en los claros o zonas de matorral y, por el contrario, una relación de repulsión entre el arbolado y el matorral, lo que confirma el carácter heliófilo de las formaciones arbustivas presentes. La relación entre el matorral y el regenerado parece claramente excluyente, aun cuando no se pueda inferir una relación de causalidad en esta exclusión a partir del análisis realizado.

Fundamento

El pinar de *Puerto Llano* es un pinar abierto de alta montaña (1750-1900 m. s.n.m.), que comparte el espacio con matorral de enebros (*Juniperus communis*), espinos (*Berberis hispanica*), piornos (*Erinacea anthyllis*) y otras especies de alta montaña. Se trata de una formación rara que no cubre normalmente grandes superficies, por las propias limitaciones que impone el relieve oromediterráneo, constituyendo una verdadera reliquia post-glacial adaptada a unas condiciones de alta montaña mediterránea muy difíciles para la vida vegetal y que deben ser conservadas.

En ambientes mediterráneos, la regeneración de gran número de especies leñosas arbóreas y arbustivas, presenta un patrón espacial que, en casos, se ha asociado a plantas ya establecidas, lo que sugeriría la existencia de un balance neto positivo de las interacciones planta-planta[1]. Por otro lado, la proximidad espacial se ha considerado tradicionalmente como sinónimo de competencia entre plantas por los recursos limitantes, básicamente luz, agua y nutrientes [1]. Es por lo que se hace necesario caracterizar, por medio de algún parámetro, las interacciones existentes entre arbolado, regenerado y/o matorral.

Existen numerosos índices que permiten cuantificar la asociación espacial entre elementos puntuales, como los árboles de una masa forestal [2,3]. Estos índices se han utilizado habitualmente para analizar la estructura espacial del estrato arbóreo adulto de las masas forestales. Pero tanto el regenerado como los estratos leñosos infra arbóreos, como el matorral o el sotobosque, difícilmente pueden cuantificarse en términos de ejemplares individuales. En estos estratos el factor más relevante para estimar su presencia y abundancia suele ser la superficie ocupada por los mismos dentro de la masa forestal, y su análisis espacial cobra la forma de polígonos en lugar de puntos. Los índices clásicos de patrones puntuales no permiten, pues, estudiar las relaciones espaciales entre el estrato arbóreo, asimilado a elementos puntuales, y los estratos de regenerado y matorral, considerados en forma de polígonos [4,5]. En este trabajo se van a investigar las relaciones espaciales entre el estrato arbóreo, considerado como un patrón de puntos, y los estratos de regenerado del arbolado, por un lado, y del matorral, por otro, considerados ambos como polígonos, lo que supone una innovación metodológica.

El estudio cobra especial interés en el ámbito elegido: un pinar natural de salgareño de la Sierra de Cazorla, de baja cobertura arbórea, donde la dinámica forestal está poco condicionada por la espesura del bosque, jugando un papel importante el resto de los estratos leñosos no arbóreos.

Metodología

Se han establecido dos parcelas de 35x35m representativas del conjunto del monte, en las que se estudia la asociación entre los estratos de arbolado, regenerado y matorral. Los mapas de árboles, regenerado y matorral, se han obtenido a través del dispositivo *FielMap*, un sistema tecnológico integrado para la colección de datos de campo, que combina un software SIG flexible con equipos electrónicos de medición para la digitalización cartográfica y mediciones dendrométricas en cualquier condición de terreno. Los datos obtenidos en campo se han utilizado para caracterizar estructuralmente la masa arbórea y para estudiar las relaciones espaciales existentes entre ésta y los estratos de regenerado y matorral. Se ha adaptado el método propuesto por Guo *et al.*[6] para estimar las relaciones espaciales entre patrones puntuales y patrones poligonales (Ec.1). Para el cálculo de este índice, se ha utilizado el sistema de información geográfica *QGIS*, el cual ha permitido realizar los distintos procedimientos, para la obtención del índice final.

El índice PP(r) compara la superficie de las vecindades de los árboles cubiertas por matorral o regenerado, con la superficie total de la parcela cubierta por matorral o regenerado.

$$PP(r) = \frac{1}{\rho n} \sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{m} \frac{Area\ del\ matorral\ incluida\ en\ las\ vecindades\ de\ radio\ r}{Area\ de\ las\ vecindades\ de\ radio\ r} \quad \text{(Ec.1)}$$

$$\rho = \frac{\sum_{j=1}^{m} Area\ del\ matorral}{Area\ de\ la\ parcela}$$

Siendo n el número de árboles de la parcela (puntos), m, el número de manchas de matorral o de regenerado (polígonos), i el número de árbol dentro del conjunto de la parcela y j cada uno de los polígonos de matorral o regenerado, según cada caso. Valores superiores a la unidad indicarán una atracción entre puntos y polígonos y repulsión para valores claramente inferiores a la unidad, siendo los valores próximos a uno indicadores de independencia espacial entre los elementos analizados. En nuestro caso, valores mayores que uno indicarán que el matorral o regenerado, se agrupan alrededor de los árboles; y lo contrario para valores claramente inferiores a la unidad. El cálculo de los índices para vecindades de radios crecientes permite, además, estimar el radio de influencia de la posible relación espacial existente.

Resultados

El análisis dasométrico de la masa adulta de pinar ha permitido detectar una estructura con mezcla irregular de clases de edad que indica una tasa adecuada de incorporaciones en el pasado, aun cuando la cobertura del pinar no es elevada.

En las figuras 1 y 2 se presentan los resultados del análisis espacial de los estratos considerados

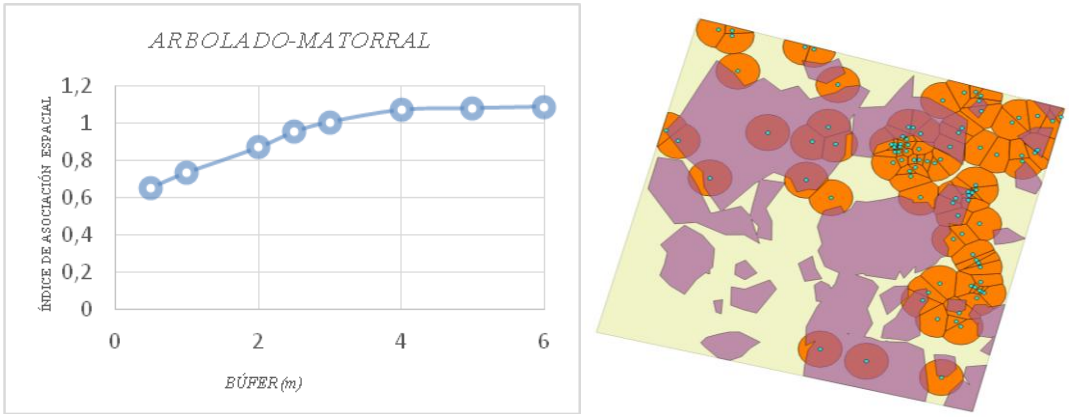


Figura 1. *Variación del índice de asociación entre el arbolado y el matorral. (izquierda). Solape del matorral en vecindades de búfer 2 metros (derecha).*

Como se observa en la fig.1, los valores del índice para el matorral son inferiores a la unidad hasta la distancia de 3-4 metros, distancia a partir de la cual se establece la independencia entre el arbolado y el matorral. Esto significa que cerca de los arboles hay menos cobertura de matorral que en el conjunto de la parcela y, por lo tanto, existe repulsión.

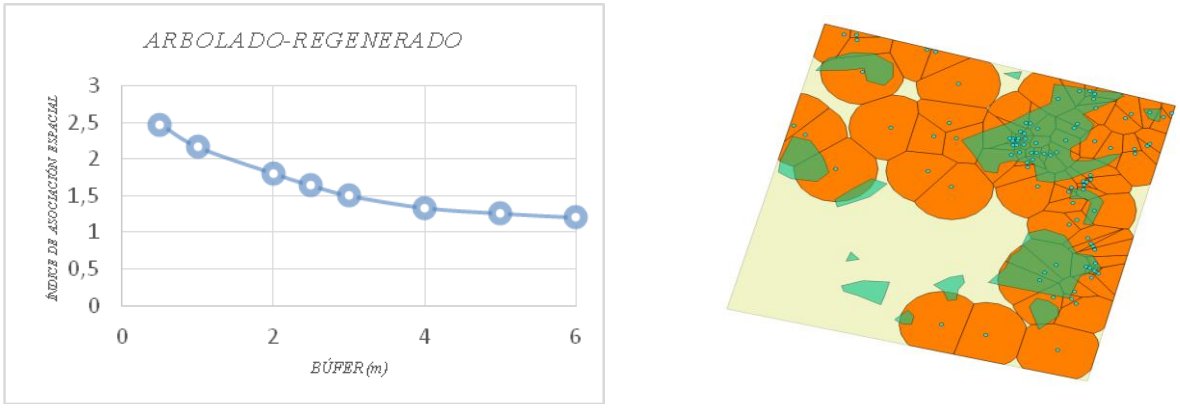


Figura 2. Variación del índice de asociación entre el arbolado y el regenerado (izquierda). Solape del regenerado en vecindades de búfer 4 metros (derecha).

En la fig. 2 se observan valores por encima de 1 para todos los búfer analizados lo que implica una relación de atracción bastante marcada entre el arbolado y el regenerado. Este resultado indica que hay más superficie cubierta de regenerado en los alrededores de los árboles, que en la media de la parcela, siendo a partir del búfer de 6 metros cuando se establece la relación de independencia entre los mismos.

Tabla 1.Relación de Asociación espacial entre matorral y regenerado.

Parcela m^2	Matorral m^2	Regenerado m^2	Solape m^2 (%)	Índice
1229,19	580,51	207,96	79,14 (38%)	0,81
1173,02	226,07	170,22	25,54 (15%)	0,78

En la tabla 1 se observa cómo el índice se encuentra por debajo de 1, lo que indica que existe una repulsión entre ambos estratos Los estratos de matorral y regenerado se presentan de forma excluyente en el espacio.

Conclusiones

El análisis espacial ha permitido detectar una relación dominante de atracción entre el estrato arbóreo y el regenerado. Por el contrario, existe una relación de repulsión entre el arbolado y el matorral, lo que confirma el carácter heliófilo de las formaciones arbustivas presentes. La relación entre el matorral y el regenerado parece claramente excluyente, aun cuando no se pueda inferir una relación de causalidad en esta exclusión a partir del análisis realizado.

Bibliografía

[1] P.A. Tíscar, Estructura, regeneración y crecimiento de *Pinus nigra* en el área de reserve Navahondona-Guadahornillos (Sierra de Cazorla, Jaén). Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid, 2004.

[2] A. Pommerening, Evaluating structural indices by reversing forest structural analysis. For. Ecol. Manage. 224, 2006, p. 266–277.

[3] G. Hui, O. Aguirre, K. Von Gadow, J. Jiménez, Analysis of spatial forest structure using neighbourhood-based variables. For. Ecol. Manage. 183, 2003, p. 137-145.

[4] B. Abellanas, S. Cuadros, J.A. Oliet. Efecto de los tratamientos selvícolas sobre la estructura espacial de los rodales forestales. 6º Congreso Forestal Español. 2013.

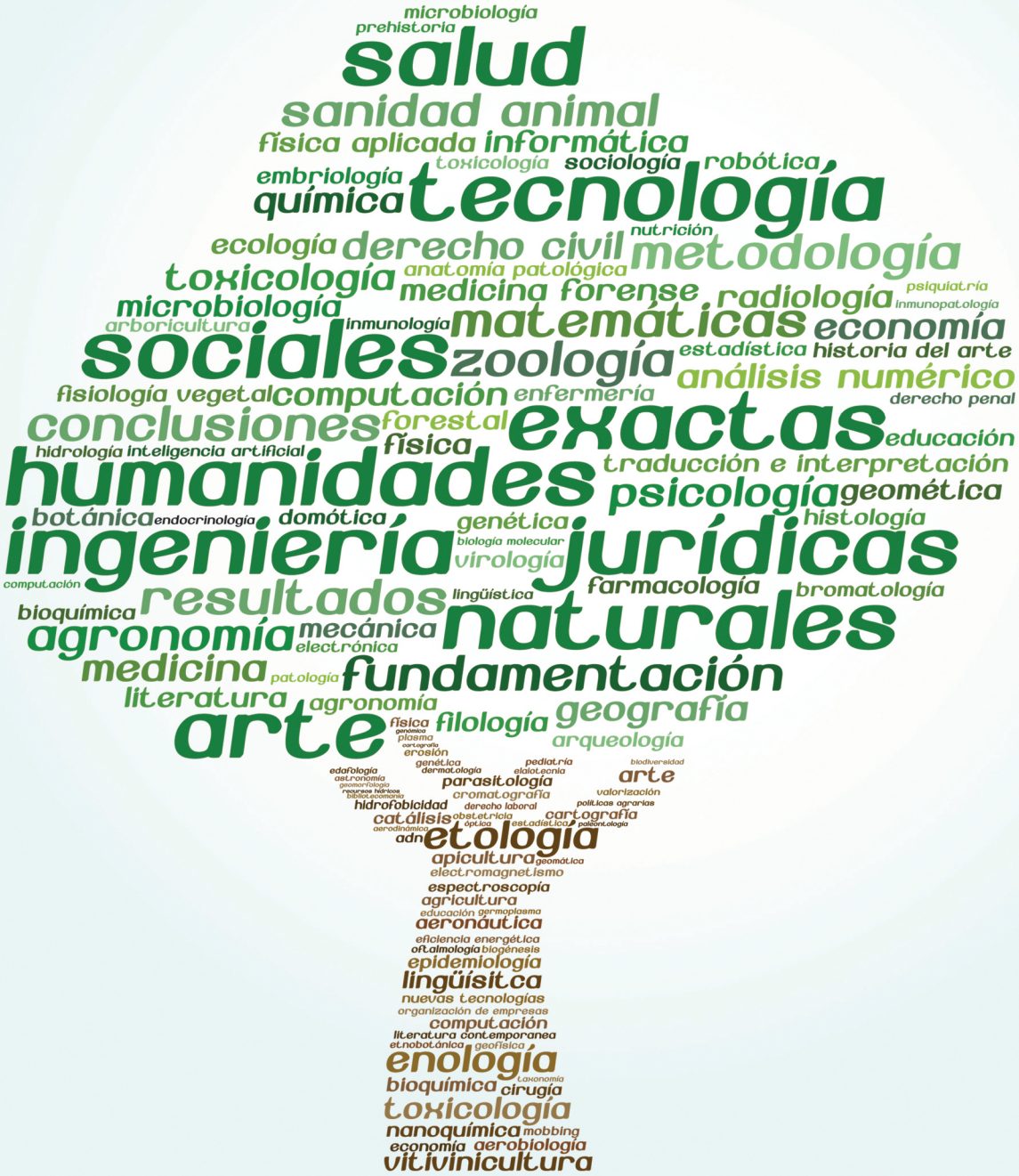
[5] V. Kint, N. Lust, R. Ferris, F.M. Olsthoorna, Quantification of forest stand and structure applied to Scots pine (Pinussylvestris L). Forest. Invest. Agr.: Sist. Recur. For, 2000, p. 147-156.

[6] L. Guo, S. Du, R Haining, L. Zhang, Global and local indicators of spatial association between points and polygons: A study of land use change. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation, 2013, p. 384-396.

UCOPress
Ediciones Universidad
de Córdoba

Investigando por un futuro mejor

Alberto Marinas Aramendía (Ed.)



UCOPress
Ediciones Universidad de Córdoba