



INVESTIGACION

CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA

VOLUMEN 9

Nº 17

2017

INVESTIGACION

CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA

VOLUMEN 9 Nº 17 2017

Director
José Luis Vázquez López

Consejo de Redacción
Francisco Javier Rodríguez Berrocal
Almudena Fernández Briera
José Luis Vázquez López

Dirección Creativa
María del Mar Vázquez Jiménez
mariadelmarvj@gmail.com

Dep. Administración y Divulgación
Raquel María Vázquez

Revista adscrita al
INSTITUTO DE CULTURA,
CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(ICCT)

www.institutociencia.es

ISSN: 1889 - 4399

DEPÓSITO LEGAL:

VG - 347 - 2009

C./ Oporto, 1, 3º

36201 Vigo

Patrocina



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE ECONOMÍA,
EMPREGO E INDUSTRIA



INSTITUTO CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA

Queda prohibida la reproducción total o parcial de cualquiera de los contenidos de esta publicación, sin citar la procedencia. La revista "Investigación" no se hace responsable, ni se identifica con artículos, ni opiniones que publican sus autores y colaboradores.

LOS INVESTIGADORES DE INSTITUCIONES, EMPRESAS, LABORATORIOS Y UNIVERSIDADES INTERESADOS EN REMITIR ARTÍCULOS, PREVIAMENTE DEBERÁN CONTACTAR CON NUESTRO DEPARTAMENTO DE REDACCIÓN PARA RECIBIR LAS NORMAS DE ENVÍO:

investigacion@galicia.com



índice

SUMARIO VOLUMEN 9 Nº 17 2017

6 - Editorial
HITOS Y RETOS DE LA INNOVACIÓN EN GALICIA
Patricia Argerey Vilar
Directora de la Axencia Galega de Innovación (Gain) Xunta de Galicia

8 - Ciliopatías
ANALISIS FUNCIONAL Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE GENES ASOCIADOS EN CILIOPATIAS
Carolina Terrón ⁽¹⁾; Diana Valverde ^{(1) (2) (3)}
(1). Departamento Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología Universidad de Vigo
(2). Research Group of Rare Diseases&Pediatric Medicine. Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur (IISGS) SERGAS-UVIGO. Hospital Álvaro Cunqueiro-Vigo
(3). Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO)

16 - Metrología del Tiempo
EL REAL INSTITUTO Y OBSERVATORIO DE LA ARMADA Y LA MEDIDA DEL TIEMPO
Teodoro López Moratalla; Francisco Javier Galindo Mendoza
Real Instituto y Observatorio de la Armada en San Fernando (Cádiz)

24 - Agrobiología
RECUPERACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL ROBLE ENANO DEL MONTE PINDO MEDIANTE CULTIVO INVITRO
San José, MC; Martínez, MT; Cernadas, MJ; Bouza, L; Corredoira, E
Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Santiago de Compostela

30 - Geología Marina y Ambiental
INNOVACIÓN EN LA ADQUISICIÓN DE DATOS GEO AMBIENTALES
Belén Rubio; Daniel Rey; Ana Bernabeu; Federico Vilas; Miguel Otero; David Campos
Grupo GEOMA. Deptº. de Geociencias Marinas y Ordenación del Territorio. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Vigo

39 - Medicina y Odontología
MEDICINA PERIODONTAL: EL IMPACTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN LA SALUD GENERAL
Yago Leira ^{(1) (2)}; Juan Blanco ⁽¹⁾
(1). Dptº. de Periodoncia. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela.
(2). Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IISG)

48 - Investigación Marina
ESTRATEGIAS DE LA OSCURIDAD: ADAPTACIONES Y MODOS DE VIDA DEL MACROZOOPLANCTON EN MAR ABIERTO
Álvaro Roura Labiaga; Alexandra Castro-Bugallo
Instituto de Investigaciones Marinas (IIM) (CSIC), Vigo

59 - Investigación en Bioquímica
NORMALIZACIÓN DE SEÑAL EN WESTERN BLOTTING CUANTITATIVO. USO DE LA PROTEÍNA TOTAL MEDIANTE LA TINCION CON AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE
Óscar Mariño Crespo; Almudena Fernández Briera⁽¹⁾; Emilio Gil Martín⁽¹⁾
Dptº. Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología. Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO). Universidad de Vigo
(1). Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo

editorial

HITOS Y RETOS DE LA INNOVACIÓN EN GALICIA

En diciembre pasado dio comienzo una nueva etapa en mi vida profesional al frente de la Axencia Galega de Innovación, con gran ilusión y, al mismo tiempo, con una enorme responsabilidad. En los próximos meses y años deberemos dar los pasos decisivos para consolidar la innovación como parte del ADN de nuestro tejido industrial y avanzar hacia una economía basada en el conocimiento. Para ello, contamos con una hoja de ruta que nos marca la senda por la que debemos caminar. Se trata de la Estrategia de Especialización Inteligente de Galicia (RIS3), que define los retos y prioridades de las políticas de I+D+i en Galicia para el periodo 2014-2020.

Proximamente contaremos, además, con un nuevo plan de I+D+i que concretará esos retos y prioridades en objetivos generales y particulares y coordinará a los agentes del sistema gallego de innovación y los recursos disponibles para alcanzar esos objetivos. Por último, también contamos con un marco estratégico más amplio, el Plan Estratégico de Galicia 2015-2020, un plan transversal a todo el ejecutivo gallego que persigue fomentar un nuevo modelo de crecimiento económico basado en la innovación y en el capital humano y que marca como objetivo en el ámbito de la investigación, el desarrollo y la innovación duplicar el gasto en I+D sobre el PIB.

El punto de partida nos sitúa en una tendencia de crecimiento que nos permite ser optimistas respecto al cumplimiento de las metas fijadas. Entre los logros alcanzados cabe destacar, en primer lugar, que hemos llegado al ecuador de la Estrategia de Especialización Inteligente de Galicia (RIS3) habiendo movilizado ya cerca de 800 millones de euros de los 1625 millones de euros previstos para todo el periodo. Además, hemos logrado que por cada euro público de ayudas el sector privado ha respondido con un euro más de inversión. La modernización del tejido industrial y el apoyo a las pymes han sido dos de las principales prioridades en estos tres primeros años.

A su vez, Galicia es referente en Compra Pública Innovadora a nivel estatal y europeo, habiendo obtenido en dos ocasiones la Xunta de Galicia el Premio Nacional de Innovación en la categoría de Compra Pública Innovadora. Este instrumento innovador de contratación en la administración está favoreciendo un cambio de cultura en el apoyo público a la I+D+i, pasando de un papel de acompañamiento a un rol más activo, a compartir riesgos y beneficiarnos de los resultados, rentabilizando al máximo la inversión pública en innovación, mejorando la prestación de los servicios públicos, creando mercado para productos y servicios innovadores y

contribuyendo al posicionamiento de Galicia en escenarios tecnológicos competitivos a nivel internacional.

La creación de un Polo tecnológico e industrial de vehículos aéreos no tripulados en Galicia, en torno al aeródromo de Rozas, es la apuesta más importante realizada hasta el momento por la Xunta de Galicia en materia de Compra Pública Innovadora, iniciativa en la que se están movilizándose 150 millones de euros. El objetivo último es mejorar la prestación de determinados servicios públicos por parte de la Administración Autonómica e impulsar en Galicia un sector con gran potencial de futuro y que tenga un impacto positivo en la economía gallega a través de la participación de numerosas empresas y centros de conocimiento, situándonos además a la vanguardia de esta tecnología a nivel internacional.

Los esfuerzos que están haciendo todos los agentes del Sistema gallego de innovación para competir a nivel internacional se ven reflejados en los resultados. En el marco del programa Horizonte 2020 de la Comisión europea, Galicia ha multiplicado por tres el porcentaje de proyectos liderados y ha doblado la cuota de fondos obtenidos, respecto al mismo periodo del anterior programa marco.

Además, desde 2013, el gasto en I+D sobre el PIB en Galicia presenta una evolución ascendente. En el bienio 2013-2015, nuestra Comunidad experimentó un crecimiento del 2,29% en el gasto en I+D sobre el PIB, mientras que el conjunto del Estado descendió en 3,93%. Además, el gasto en I+D empresarial creció en este periodo en Galicia, situándose por encima de las tres Comunidades autónomas con mayor esfuerzo en I+D y convirtiéndose en la quinta con mayor crecimiento en la inversión privada en I+D en este periodo. Por su parte, el gasto público en I+D también creció, incrementándose en un 10,4% entre 2013 y 2015.

Estos datos nos colocan en una senda de crecimiento, pero todavía queda mucho trabajo por hacer. Seguiremos por tanto focalizando nuestros esfuerzos a medio y largo plazo en tres grandes ámbitos: la captación y retención de talento innovador, la transferencia de conocimiento al mercado y el apoyo a nuestras pymes.

Continuaremos apostando por atraer y retener investigadores excelentes en Galicia y favorecer la contratación de nuevos investigadores no sólo en nuestras universidades sino también en el resto de agentes del Sistema gallego de innovación: centros tecnológicos, centros de conocimiento y empresas. También continuaremos apoyando el emprendimiento

innovador, a través de la Red Gallega de Aceleradoras, para que todas las buenas ideas lleguen al mercado y se conviertan en un éxito empresarial.

En el ámbito de la transferencia de conocimiento, y sabiendo que tenemos en Galicia grupos de investigación excelentes en nuestras universidades y centros de conocimiento, seguiremos impulsando iniciativas que nos ayuden a trasladar esas ideas al mercado para que la inversión en I+D+i obtenga los mayores retornos en términos de bienestar social y económico.

Por último, nos hemos propuesto acompañar a las pequeñas y medianas empresas en el convencimiento de que la innovación también es para ellas, que no solo incumbe a las grandes. La innovación, de hecho, debe ser entendida como un instrumento fundamental para incrementar su competitividad y, por tanto, para lograr un mayor crecimiento económico de nuestra Comunidad.

En definitiva, desde la Xunta de Galicia, continuaremos apoyando todas las etapas del proceso de investigación, desarrollo e innovación con el objetivo de completar el mapa de apoyos más completo a disposición del Sistema Gallego de Innovación.

Patricia Argrey Vilar

Directora de la Axencia Galega de Innovación
Xunta de Galicia

ANÁLISIS FUNCIONAL Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE GENES ASOCIADOS EN CILIOPATÍAS

Carolina Terrón¹, Diana Valverde^{1,2,3}

¹ Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo

² Research Group of Rare Diseases & Pediatric Medicine, Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur (IISGS), SERGAS-UVIGO, Hospital Álvaro Cunqueiro de Vigo

³ Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO) (Centro Singular de Investigación de Galicia), Universidad de Vigo

RESUMEN

El grupo de investigación ha detectado previamente en una familia con Síndrome de Bardet-Biedl una mutación en el gen *CORO2B* con una probabilidad muy alta de ser patogénica, por lo que se procedió a la secuenciación de este gen en distintas familias que presentaban esta enfermedad. El objetivo era detectar otras variantes que permitiesen confirmar que se trata de un gen candidato para esta patología. Este síndrome se caracteriza por una elevada heterogeneidad tanto fenotípica como genotípica (hasta el momento han sido identificados 21 genes relacionados con ella), lo que dificulta su estudio. Para llevarlo a cabo, se secuenciaron todos los fragmentos del gen para cada uno de los pacientes y mediante el programa BioEdit se estudió su secuencia comparándolos con la secuencia del gen original. Tras este proceso se detectaron una serie de variaciones, tanto intrónicas como exónicas.

La gran mayoría descritas previamente y con una probabilidad de ser patogénica muy baja, excepto una variación exónica no descrita previamente. Esta última, posiblemente patogénica. Los resultados no son suficientes para concluir que se trate de un gen asociado a esta ciliopatía, por lo que sería necesario seguir trabajando en estudios de funcionalidad del gen *CORO2B* para obtener un resultado concluyente.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Bardet-Biedl (SBB) es un desorden genético multisistémico, con una elevada heterogeneidad tanto genética como fenotípica. Está caracterizado por defectos congénitos y/o tardíos y asociado a patologías tales como: degeneración de la retina, obesidad, polidactiliapostaxial,

hipogonadismo, retraso mental y malformaciones renales. Los pacientes pueden presentar también manifestaciones clínicas adicionales como asma, defectos craneoencefálicos, anosmia, pérdida auditiva o diabetes (Lindstrand et al., 2016).

El origen del SBB está ligado a una disfunción de los cilios, se ha demostrado que estos orgánulos participan en procesos tan importantes como la señalización intracelular, dando lugar a respuestas biológicas relacionadas con el control del ciclo celular, desarrollo y diferenciación, migración y control de la polaridad celular, transducción de estímulos sensoriales y mantenimiento y proliferación de células madre. La ausencia completa de estos es incompatible con la vida, y su disfunción está relacionada con un gran número de desórdenes clínicos conocidos como ciliopatías (Novas et al., 2015).

Las ciliopatías engloban a un grupo de enfermedades asociado con mutaciones en genes que codifican proteínas ciliares resultando en fallos en la formación y función de los cilios. Debido a que estos se distribuyen de forma ubicua y están presentes en una sola copia por célula en la gran mayoría de los vertebrados, su disfunción puede dar lugar a un gran número de fenotipos o desórdenes clínicos afectando a tejidos muy diferentes. (Waters&Beales, 2011) (Novas et al., 2015). Además estas enfermedades están caracterizadas por una gran variación fenotípica intra e inter familiar, e incluso distintas mutaciones en un mismo gen pueden dar lugar también a distintos fenotipos (Davis & Katsanis, 2012).

Debido a que todas estas patologías están relacionadas con procesos asociados a los cilios, todas ellas tienen en común una serie de características clínicas. Estas pueden ser

utilizadas para caracterizar e identificar nuevas ciliopatías, así como nuevas proteínas relacionadas con los cilios o para estudiar la biología de estos (Tobin, 2010).

A pesar de que se trata de enfermedades raras, hay tres razones principales que hacen que sea importante su estudio. En primer lugar, las ciliopatías causan patologías multisistémicas severas que resultan en una muy baja calidad de vida y muerte temprana en la mayoría de los pacientes; actualmente no hay cura y hay muy pocos tratamientos, por lo que entender estas enfermedades es importante para desarrollar terapias y tratamientos para los pacientes. En segundo lugar, muchos de los desórdenes presentes en los pacientes que sufren ciliopatías, tales como quistes en el riñón, degeneración de la retina, polidactilia u obesidad, son muy comunes en la población general. Y en tercer lugar, estudiar este tipo de patologías, aporta información acerca de la biología básica de los cilios y su rol en la señalización celular y el desarrollo (Tobin, 2010).

Las investigaciones sobre ciliopatías han sido enfocadas principalmente en los cilios, sin embargo las proteínas asociadas con ciliopatías abarcan además un amplio rango de procesos tan diversos como transporte vesicular, actividad de chaperonas moleculares o regulación del citoesqueleto. En términos de distribución subcelular, estas proteínas ciliares se encuentran localizadas en distintos puntos dentro de las células (Hernandez-Hernandez & Jenkins, 2015).

El vínculo inicial entre el SBB y los cilios proviene de la identificación de una mutación en homocigosis en el gen BBS8 en una familia, presentando una inversión corporal en la configuración izquierda-derecha (R). La caracterización de BBS8 demostró que la proteína se encontraba en el centrosoma y el cuerpo basal de los cilios. Estudios posteriores han demostrado que la mayoría de las proteínas relacionadas con el SBB comparten este patrón de localización (Novas et al., 2015).

Algunas de las proteínas relacionadas con el SBB forman un complejo proteico denominado BBSoma. El BBSoma es un complejo proteico estable que participa en la biogénesis de los cilios primarios. Está formado por 7 genes BBS: (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS 8 y BBS9) y BIP10 (Jin&Nachury, 2009). Este complejo se ha demostrado que juega un papel muy importante en el transporte intraflagelar (Novas et al., 2015). En este complejo, además, no se han encontrado proteínas codificadas por genes asociados con otras ciliopatías (Novarino et al., 2011).

La principal función del BBSoma es la de la biogénesis de la membrana ciliar, participando en el transporte intraflagelar. Tres genes BBS adicionales a los que forman el complejo proteico funcionan como homólogos a las chaperonas de tipo II (BBS6, BBS10 y BBS12) e interactúan con las proteínas para formar un complejo llamado complejo BBS-Chaperonina. Este es imprescindible para la síntesis del BBSoma (Zhang et al., 2012).

La gran heterogeneidad tanto genotípica como fenotípica asociada a esta enfermedad, así como el número de familias en las que no se ha podido identificar todavía el gen responsable, hace que el estudio molecular sea muy complejo. Hasta el momento se han identificado 21 genes relacionados con esta enfermedad, el último (BBS21) ha sido descrito en 2016 (Heonet et al., 2016).

Otro aspecto que dificulta el estudio de esta enfermedad es que, hasta ahora, se trata de la única ciliopatía que puede presentar un modo de herencia diferente del estrictamente recesivo (Braun &Hildebrandt, 2016). En 2011 se propuso un patrón de herencia trialélico, que requiere tres alelos mutantes en dos o más loci para manifestar el fenotipo (Katsanis et al., 2001). Según este modelo de herencia, una variación en un solo loci, ya sea en homocigosis o heterocigosis no sería suficiente para manifestar el fenotipo (Nasir&Liu, 2002).

Algo que podría explicar por qué el SBB es una de las ciliopatías que presenta una mayor pleiotropía, que podría ser relevante para el entendimiento completo de la etiología del síndrome, es el hecho de que existen actualmente datos que demuestran que, al menos el papel de algunas de las proteínas BBS no esté restringido funcionalmente a los cilios primarios (Novas et al., 2015).

Hoy en día la técnica de secuenciación es una herramienta imprescindible para aplicar en cualquier estudio molecular, las nuevas tecnologías de alto rendimiento, como las técnicas de "NextGenerationSequencing (NGS)" permiten aumentar la calidad del estudio de las muestras así como obtener un menor ruido de fondo en las secuencias obtenidas (Buermans& den Dunnen, 2013). Esta técnica tiene un gran número de aplicaciones tanto en genómica, como en la detección de variaciones genéticas en el estudio de desórdenes hereditarios raros. De hecho, el exponencial decrecimiento del coste de esta técnica ha resultado en un gran cambio en el estudio de las enfermedades genéticas raras en los últimos años (Koboldtet et al., 2013).

Las nuevas tecnologías tales como NGS exónica o de genoma completo, han permitido que en los últimos años aumente considerablemente el número de genes identificados, lo que posibilita la capacidad de avanzar en la meta de conocer la base molecular de todas las enfermedades (Alkuraya, 2013).

Las técnicas de NGS han tenido un impacto muy importante en el conocimiento sobre trastornos genéticos en un período de tiempo muy corto, y esta tendencia continuará, permitiendo resolver un gran número de cuestiones. Esta técnica es, sin duda, una tecnología clave para la investigación biomédica y para los estudios genómicos (Koboldt et al., 2013).

Gracias a estas tecnologías aplicadas en la cohorte de pacientes disponibles, se han podido identificar nuevos genes candidatos para el SBB.

Hemos identificado en una familia SBB, una mutación (p.(Leu194Gln) c.581T>A) en el gen CORO2B con una probabilidad de ser patogénica muy alta, según la evaluación realizada mediante programas informáticos.

El gen CORO2B, coronin 2B, pertenece a la familia de coroninas tipo II, una familia muy conservada de reguladores del citoesqueleto de actina, que promueven la movilidad celular (Chan et al, 2011). Participa tanto en la unión como en el ensamblaje de actina (Blankenhorn et al., 2009). Se ha visto que presenta un valor de expresión muy elevado en retina y cerebro en relación al resto de zonas estudiadas, siendo esta máxima en el córtex prefrontal. Se ha descrito una expresión mucho menor que en estas áreas, pero mayor que en el resto, en adipocitos y músculo liso (Biogps.org, 2017).

Se encuentra ubicado en el cromosoma 15, está formado por 12 exones, de los cuales sólo los 11 últimos son codificantes, y tiene una longitud de 3569 pares de bases. Por el momento, en las bases de datos consultadas se describen 338 variantes (Ensembl.org, 2017).

La proteína para la que codifica este gen (Coronina-2B) está formada por 480 aminoácidos y tiene una masa molecular de 54953 Da (GeneCards, 2017)

Este gen ha sido considerado previamente como posible candidato para otra ciliopatía, el síndrome de Usher (USH) tipo 3 (Dad et al., 2010) y tipo 1 sin que haya sido posible confirmar su vinculación en ninguno de los casos (Ahmed et al., 2009).

Cuando se encuentra una variante en un gen que no ha sido asociado al fenotipo de ningún paciente, este se considera gen

de significado incierto (GUS, Gene of Uncertain Significance). Según las recomendaciones de la American College of Medical Genetics and Genomics Association, para poder determinar la implicación de estos genes en una patología determinada hacen falta más evidencias que las necesarias para clasificar como patogénica una variante si ya existe un fenotipo asociado a ese gen. Se consideraría una evidencia positiva encontrar casos adicionales con un fenotipo similar y variantes patogénicas en el mismo gen (Richards et al., 2015).

Para poder determinar la implicación del gen CORO2B en el Síndrome de Bardet-Biedl, el objetivo de este trabajo ha sido encontrar alguna otra mutación patogénica en el mismo gen en otra familia de pacientes y de este modo, poder aportar datos que puedan confirmar que se trata de un gen candidato para el SBB.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIG Galicia) y los requisitos para el desarrollo del trabajo se ajustan a lo establecido por la Declaración de Helsinki. Para la realización del estudio se obtuvo autorización escrita de los pacientes o sus tutores legales.

Utilizando un kit de extracción de ADN (kit FlexiGene DNA de Quiagen (Alemania)) se procedió a la extracción del ADN de 10 pacientes diagnosticados de SBB a partir de muestras de sangre. Partiendo de estas muestras de ADN se procedió al análisis de variaciones en los distintos fragmentos del gen de interés. Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la amplificación de las regiones exónicas y secuencias flanqueantes del gen CORO2B mediante el proceso de PCR. Para comprobar que estos fragmentos habían amplificado correctamente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 1). Una vez se comprobó que la amplificación se había realizado correctamente, se purificaron los productos de la PCR mediante ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Affymetrix USB; Cleveland, Ohio, EE.UU.). Una vez purificados los productos de PCR se procedió a la secuenciación mediante el método de Sanger mediante BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies; Austin, Texas, EE.UU.). Posteriormente las muestras se precipitaron mediante sales y se procedió a la migración de los fragmentos. El análisis de la secuencias se llevó a cabo mediante el programa para detectar variaciones con la secuencia original. Una vez caracterizadas los cambios detectados se procedió al análisis *in silico* para comprobar si los cambios detectados afectaban al proceso de splicing y/o producían alteraciones en el producto proteico final.

TABLA 1: REPRESENTACIÓN DE LAS VARIACIONES ENCONTRADAS EN LA COHORTE DE PACIENTES

VARIACIÓN	Nº VECES ENCONTRADA	TIPO	POSICIÓN
c.-58 C>T	4	Intrónica	Intrón 1-2
c.469-10 T>G	10	Intrónica	Intrón 4-5
p.(Pro 167=) c.501 G>A	1	Exónica - Sinónima	Exón 5
c.1066-94 C>G	4	Intrónica	Intrón 9-10
c.1066-78 T>G	1	Intrónica	Intrón 9-10
c.1296+27 C>T	5	Intrónica	Intrón 11-12
c.*472 C>T	3	Exónica - No codificante	Exón 12
p.(Ile 345=) c.1035 C>T	1	Exónica – Sinónima	Exón 9
p. (Ala129Val) c.371 C>T	1	Exónica	Exón 4

TABLA 2: REPRESENTACIÓN DE LA PUNTUACIÓN OBTENIDA PARA LOS SITIOS DE SPLICING TENIENDO EN CUENTA LOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS (FRUITFLY.ORG, 2017)

VARIACIÓN	SNP	EFECTO EN EL SPLICING	CAMBIOS EN EL SPLICING	
			Donor	Aceptor
c.1-58 C>T	rs2291534	Neutral	Sin cambios. Puntuación: 0,93	Sin cambios. Puntuación: 0,97
c.469-10 T>G	rs3736272	Neutral	Sin cambios. Puntuación: 0,45	Con la variación, la puntuación aumenta 3 puntos, de 0,96 a 0,99
c.1066-94C>G	rs1491640	Neutral	Sin cambios. Puntuación: 0,98	Sin cambios. Puntuación: 0,92
c.1296+27C>T	rs55921407	Neutral	Sin cambios. Puntuación: 1	Sin cambios. Puntuación: 0,99
c.1066-78T>G	rs570905113	Neutral	Sin cambios: Puntuación: 0,98	Sin cambios: Puntuación: 0,92
p.(Pro 167=) c.501 G>A	rs36077420	Neutral	Sin cambios. Puntuación: 0,45	Sin cambios. Puntuación: 0,96
p.(Ile 345=) c.1035 C>T	rs33913544	Neutral	Sin cambios. Puntuación: 0,99	Sin cambios. Puntuación: 0,90

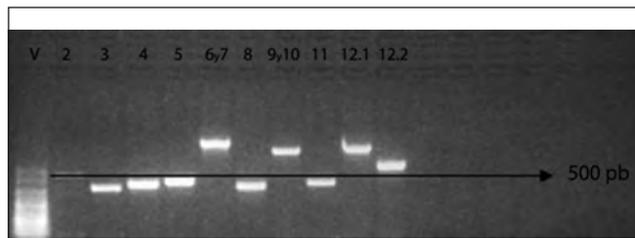


FIGURA 1: RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS PARA COMPROBAR EL TAMAÑO DE CADA UNO DE LOS FRAGMENTOS EN COMPARACIÓN CON EL MARCADOR HYPERLADDER V.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras secuenciar las muestras de 10 pacientes, las secuencias se analizaron tanto en sentido Forward como Reverse para comprobar la presencia de variantes tanto en homocigosis como en heterocigosis usando el programa informático BioEditSequence ®.

Tras la comparación de las secuencias se encontraron los cambios en la cohorte de pacientes representados en la tabla 1 y en la figura 2.

Todas las variaciones se han nombrado de acuerdo a la nomenclatura establecida por Dunnen et al. (2016). Las frecuencias poblacionales que se muestran a continuación se obtuvieron de la base de datos Ensembl (Ensembl.org, 2017).

- **c.-58 C>T (rs2291534):** Se trata de una variación intrónica que aparece en el intrón 1-2 en heterocigosis. Está presente en el 26% de la población.
- **c.469-10 T>G (rs3736272):** Se trata de una mutación intrónica que aparece en heterocigosis y en homocigosis, presente en el intrón 4-5. Este polimorfismo aparece en un 33.5% de la población en heterocigosis y en un 48% en homocigosis.
- **p. (Pro167=) c.501 G>A (rs36077420):** Se trata de una mutación sinónima, ya que no provoca cambio de aminoácido que codifica, ya que ambos codifican para Prolina. Se encuentra en heterocigosis. Aparece en el 2.8% de la población.
- **c.1066-94 C>G (rs1491640):** Se trata de una mutación intrónica presente en heterocigosis que afecta al 16% de la población.
- **c.1066-78 T>G (rs570905113):** Se trata de una variación intrónica presente en heterocigosis que afecta al 1% de la población.
- **c.1296+27C>T (rs55921407):** Se trata de una variación intrónica que aparece tanto en homocigosis como en heterocigosis. Está presente en heterocigosis en un 17% de la población y en homocigosis en un 2.7%
- **c.*472C>T (rs4550403):** Se trata de una variación en heterocigosis presente en una región exónica no codificante. Esta variación aparece en un 33% de la población.
- **p. (Ile 345=) c.1035 C>T (rs33913544):** Se trata de una variación sinónima, por lo que no supone un cambio en el aminoácido que codifica, ya que ambos codifican para Isoleucina (Ile). Esta variación aparece en heterocigosis y aparece en un 19.5% de la población.
- **p. (Pro Ala129Val) c.371 C>T:** Se trata de una variación exónica en heterocigosis, no descrita previamente que supone un cambio aminoacídico de Alanina a Valina en la posición proteica 129.

Una vez detectados los cambios se procedió a realizar un análisis in silico cada uno de ellos para comprobar si producían algún efecto en la proteína. Las variantes exónicas e intrónicas se analizaron con el programa BDGP para determinar su papel en el proceso desplicing, como se representa en la tabla 2. Y, posteriormente las variantes exónicas se analizaron con el programa PolyPhen para determinar su papel en la estructura proteica.

De estos resultados podemos destacar que las variaciones encontradas en la cohorte de pacientes que afectan a las distintas regiones del gen y que habían sido descritas con anterioridad no tienen efecto patógeno sobre este, como refleja la tabla 2.

Sin embargo, el cambio localizado en la región exónica 4 encontrado en la familia GBB18 no había sido descrito previamente. Consiste en el cambio de una citosina por una timina en la posición proteica 129 que supone un cambio de una alanina (GCG) por una valina (GTG). Este cambio podría resultar en una alteración de la funcionalidad de la proteína.

Los resultados mediante el programa informático PolyPhen clasifican a esta mutación como posiblemente patogénica pudiendo ejercer algún efecto sobre la funcionalidad y estructura del gen.

Esta mutación está situada en el dominio proteico WD40 repeat. Este dominio se ha descrito en proteínas implicadas en un gran rango de funciones que van desde la transducción de

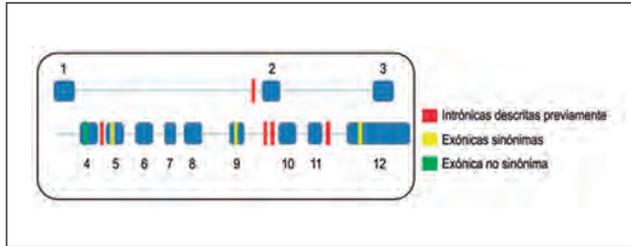


FIGURA 2: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS DURANTE EL ESTUDIO EN LOS DISTINTOS FRAGMENTOS DEL GEN CORO2B

señales y regulación transcripcional hasta el control del ciclo celular y la apoptosis (Stimimannet al., 2010). Este dominio ha sido descrito en proteínas relacionadas con ciliopatías, importantes para la integridad de los cilios (Beck et al., 2014).

El SBB presenta un método de herencia recesivo, sin embargo, esta variación aparece en heterocigosis. Podría ser que en este paciente hubiese otra mutación en alguna región del gen no estudiada, como una región intrónica que no haya sido analizada y que pueda dar lugar a unsplicing alternativo, por lo que sería necesario la realización de un estudio de ARN. Debido a que se trata de una enfermedad con herencia compleja, otra posible explicación podría ser que este gen actúe como un modulador de la expresión genética ejerciendo su papel sobre el gen responsable del fenotipo.

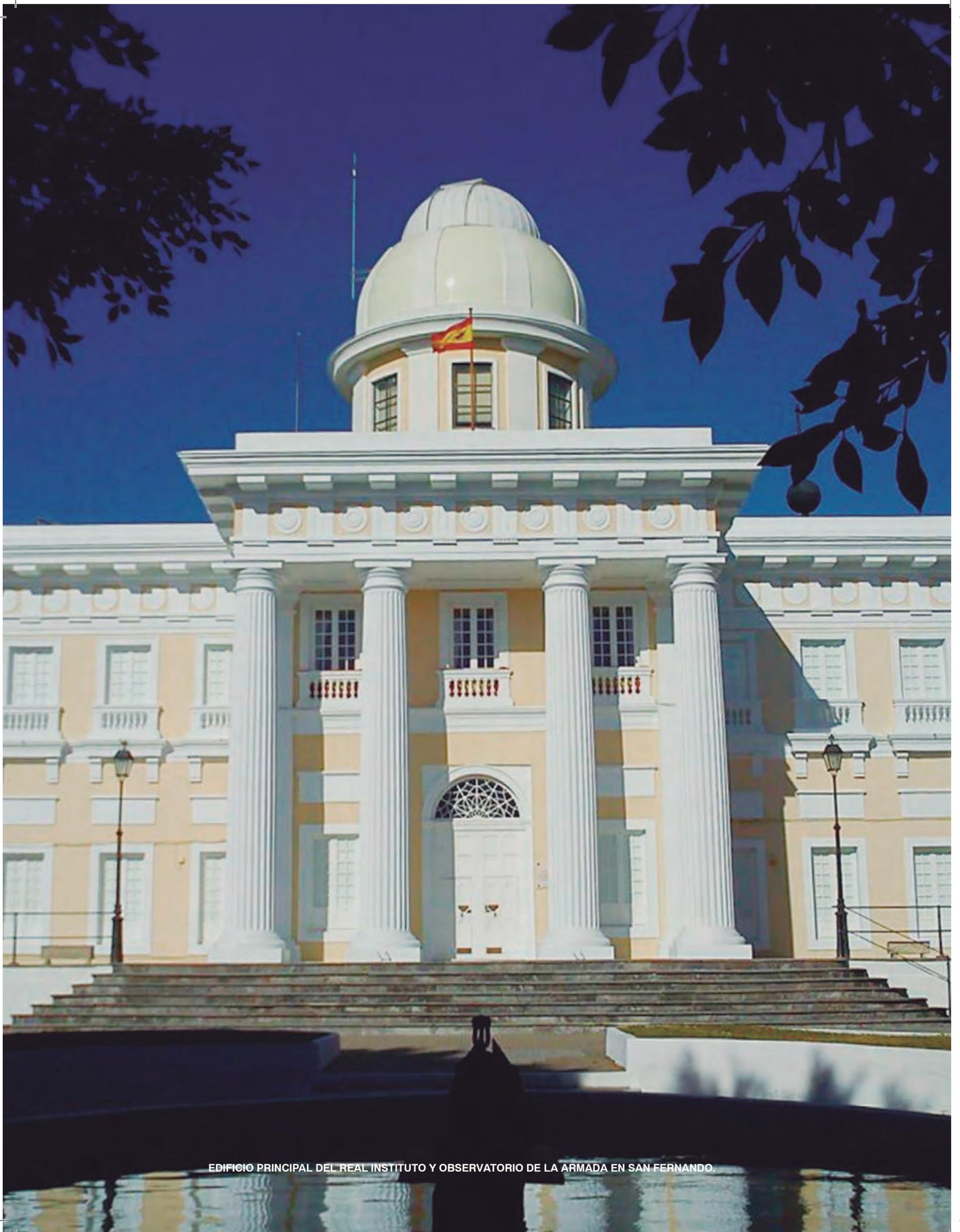
Para poder demostrar que la mutación encontrada en el exón 4 de la familia GBB18 es patogénica, lo que podría apoyar la hipótesis de que el gen CORO2B es un buen candidato para la ciliopatía SBB, sería necesario la realización de estudios de funcionalidad para demostrar que la alteración de función de la proteína y su efecto patogénico sobre el paciente. Estudios de expresión de ARN nos ayudarían a determinar si la mutación está implicada en la síntesis de ARN, y sería necesario completar con el estudio proteico a través de las técnicas de Western-Blot para evaluar posibles alteraciones postraduccionales que pudieran tener lugar. Por otro lado, la realización de estudios de colocalización nos ayudaría a determinar la relación de la proteína con los cilios.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos parecen apoyar la hipótesis que se plantea, sin embargo, no permiten confirmar que el gen CORO2B esté asociado a la ciliopatía SBB, haría falta realizar precisos estudios de funcionalidad de la mutación encontrada en la familia BBS18 para confirmar esta hipótesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed, Z., Riazuddin, S., Khan, S., Friedman, P., Riazuddin, S. & Friedman, T. (2009). USH1H, a novel locus for type I Usher syndrome, maps to chromosome 15q22-23. *Clin Gens*, 75: 86-91.
2. Alkuraya, F. S. (2013) The application of next-generation sequencing in the autozygosity mapping of human recessive diseases. *Hum Genet*, 132: 1197-1211.
3. Beck, B., Phillips, J., Bartram, M., Wegner, J., Thoenes, M., Pannes, A., Sampson, J., Heller, R., Göbel, H., Koerber, F., Neugebauer, A., Hedergott, A., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Thiele, H., Altmüller, J., Toliat, M., Staubach, S., Boycott, K., Valente, E., Janecke, A., Eisenberger, T., Bergmann, C., Tebbe, L., Wang, Y., Wu, Y., Fry, A., Westerfield, M., Wolfrum, U. & Bolz, H. (2014). Mutation of POC1B in a Severe Syndromic Retinal Ciliopathy. *Hum Mutat*, 35: 1153-1162.
4. Biogps.org. (2017). BioGPS - your Gene Portal System. Recuperado el 9 de febrero de 2017 de <http://biogps.org/#goto=genereport&id=10391>
5. Blankenhorn, E., Bryan, G., Kossenkov, A., Clark, L., Zhang, X., Chang, C., Horng, W., Pletscher, L., Cheverud, J., Showe, L. & Heber-Katz, E. (2009). Genetic loci that regulate healing and regeneration in LG/J and SM/J mice. *Mamm Genome*, 20: 720-733.
6. Braun, D. & Hildebrandt, F. (2016) Ciliopathies. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology*. Recuperado el 14 de marzo de 2017 de <http://cshperspectives.cshlp.org/content/early/2016/10/28/cshperspect.a028191.full.pdf+html?sid=7cd2747f-db54-4a4f-9db8-5a679fdb861e>
7. Buermans, H.P.J. & den Dunnen, J.T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 1842: 1932-1941.
8. Chan, K., Creed, S. & Bear, J. (2011). Unraveling the enigma: progress towards understanding the coronin family of actin regulators. *Trends Cell Bio*, 21: 481-488.
9. Dad, S., Østergaard, E., Thykjaer, T., Albrechtsen, A., Ravn, K., Rosenberg, T. & Møller, L. (2010). Identification of a novel locus for a USH3 like syndrome combined with congenital cataract. *Clin Gens*, 78: 388-397.
10. Database, G. (2017). CORO2B Gene - GeneCards | COR2B Protein | COR2B Antibody. *Genecards.org*. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=hgnc&id=2256
11. Davis, E. & Katsanis, N. (2012). The ciliopathies: a transitional model into systems biology of human genetic disease. *Curr Opin Genet Dev*, 22: 290-303.
12. Dunnen, J.T., Dalgleish, R., Maglott, D.R., Hart, R. K., Greenblatt, M.S., McGowan Jordan, J. & Taschner, P.E. (2016). HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 Update. *Hum Mutat*, 37: 564-569.
13. Ensembl.org. (2017). Transcript: CORO2B-001 (ENST00000261861.9) - Variants - Homo sapiens - Ensembl genome browser 87. Recuperado el 9 de febrero de 2017 de http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000103647;r=15:68578969-68727806;t=ENST00000261861
14. Fruitfly.org. (2017).BDGP: Splice Site Prediction by Neural Network. Recuperado el 30 de marzo de 2017 de http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
15. Heon, E., Kim, G., Qin, S., Garrison, J.E., Taveres, E., Vincent, A., Nuangchamnong, N., Scott, C.A., Slusarski, D.C & Sheffield, V.C. (2016). Mutations in C8ORF37 cause Bardet-Biedl syndrome (BBS21). *Hum Mol Genet*, 25: 2283-2294.
16. Hernandez-Hernandez, V. & Jenkins, D. (2015) Advances in the understanding of the BBSome complex structure and function. *ResReports Biology*, 6: 191:201.
17. Jin, H. & Nachury, M. (2009). The BBSome. *Curr Biol*, 19: R472-R473.
18. Katsanis, N., Ansley, S., Bandano, J., Eichers, E., Lewis, R., Hoskins, B., Scambler, P., Davidson, W., Beales, P. & Lupski, J. (2001) Triallelic Inheritance in Bardet-Biedl Syndrome, a Mendelian Recessive Disorder. *Science*, 293: 2256-2259.
19. Koboldt, D., Steinberg, K., Larson, D., Wilson, R. & Mardis, E. (2013). The Next-Generation Sequencing Revolution and Its Impact on Genomics. *Cell*, 155: 27-38.
20. Lindstrand, A., Frangakis, S., Carvalho, C., Richardson, E., McFadden, K., Willer, J., Pehlivan, D., Liu, P., Padiaditakis, I., Sabo, A., Lewis, R., Banin, E., Lupski, J., Davis, E. & Katsanis, N. (2016). Copy-Number Variation Contributes to the Mutational Load of Bardet-Biedl Syndrome. *Am J Hum Gen*, 99: 318-336.
21. Nasir, J. & Liu, B. (2002). HotSpots. *Clin Gens*, 61: 330-334.
22. Novarino, G., Akizu, N. & Gleeson, J. (2011). Modeling Human Disease in Humans: The Ciliopathies. *Cell*, 147: 70-79.
23. Novas, R., Cardenas-Rodriguez, M., Irigoien, F. & Badano, J. (2015). Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction?. *FEBS Lett*, 589: 3479-3491.
24. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K. & Rehm, H. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17: 405-423.
25. Stirnimann, C., Petsalaki, E., Russell, R. & Müller, C. (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *TIBS*, 35: 565-574.
26. Tobin, J. (2010) Introduction. En: *The Ciliopathies. A functional and therapeutic investigation*. USA: Lambert, pp. 15-51.
27. Waters, A. & Beales, P. (2011). Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr Nephrol*, 26: 1039-1056.
28. Zhang, Q., Yu, D., Seo, S., Stone, E. & Sheffield, V. (2012). Intrinsic Protein-Protein Interaction-mediated and Chaperonin-assisted Sequential Assembly of Stable Bardet-Biedl Syndrome Protein Complex, the BBSome. *J Biol Chem*, 287: 20625-20635.



EDIFICIO PRINCIPAL DEL REAL INSTITUTO Y OBSERVATORIO DE LA ARMADA EN SAN FERNANDO.

EL REAL INSTITUTO Y OBSERVATORIO DE LA ARMADA Y LA MEDIDA DEL TIEMPO

Teodoro López Moratalla, Francisco Javier Galindo Mendoza

Real Instituto y Observatorio de la Armada en San Fernando

Tal y como establece el artículo 4.1 de la Ley 32/2014, de 22 de diciembre, de Metrología, “*La hora oficial se establecerá, por real decreto, con referencia a la escala de tiempo universal coordinado materializada por el Real Instituto y Observatorio de la Armada en San Fernando*”. Y anteriormente a esta ley, el Real Decreto 1308/1992, de 23 de octubre, había declarado al Laboratorio del Observatorio como laboratorio depositario del Patrón Nacional del Tiempo y laboratorio asociado al Centro Español de Metrología.

En lo que sigue se expone cómo ha evolucionado la concepción del tiempo y su definición, hasta llegar a la citada escala de Tiempo Universal Coordinado (UTC) y la introducción de los “segundos intercalares” que actualmente forman parte de su definición, procurando huir de tecnicismos, aunque manteniendo el rigor que el tema requiere.

TIEMPO MEDIO. UT

El tiempo es un concepto complejo y la forma de entenderlo y medirlo ha evolucionado a lo largo de la historia. Hasta hace unas pocas décadas, para medirlo se utilizaba el movimiento

aparente de los astros, consecuencia de la rotación de la Tierra. Las dos referencias utilizadas habitualmente en cronometría son las estrellas y el Sol¹.

Sólo consideraremos el Sol, cuyo movimiento aparente en el firmamento define el *tiempo solar verdadero o tiempo solar aparente*. La unidad de medida que surge de forma natural es el *día solar verdadero o aparente*, definido como el intervalo transcurrido entre dos pasos consecutivos del Sol por el meridiano del lugar². Un día se divide en 24 horas, que a su vez se dividen en 60 minutos, cada uno de los cuales tiene 60 segundos. Esta división no se justifica astronómicamente, sino que se debe a razones históricas.

La hora de tiempo solar verdadero en un instante será el tiempo transcurrido desde el paso del Sol por el meridiano.

- 1 El movimiento aparente de la Luna también se utiliza como referencia para medir el tiempo, pero en el campo de la cronología. La Luna da origen a los meses del año y es la base de algunos calendarios como el católico, en lo referente a la celebración de la Pascua, o el islámico
- 2 Tradicionalmente, el día solar verdadero comienza con el paso del Sol por el meridiano superior del lugar, de manera que las 0 horas de tiempo solar verdadero coinciden con el mediodía local.

Esta hora es la que proporciona un reloj de sol y tiene una relación directa con el horario del Sol, coordenada que los marinos utilizamos regularmente en navegación astronómica. La relación es una simple regla de tres, ya que en 24 horas de tiempo solar verdadero el horario del Sol se incrementa en 360° , de donde se obtiene la conocida equivalencia de que en una hora el horario aumenta 15° .

Lamentablemente, los días (y los segundos) solares verdaderos no duran lo mismo a lo largo del año. El movimiento aparente del Sol es el resultado de la combinación del movimiento de traslación de la Tierra alrededor del Sol y del movimiento de rotación de la Tierra alrededor de su eje. Suponiendo que éste último es uniforme, que como se verá es mucho suponer, el movimiento resultante no lo es por dos motivos: la excentricidad de la órbita terrestre y la inclinación de dicha órbita respecto al ecuador.

De acuerdo con la primera ley de Kepler, la órbita de la Tierra es una elipse con el Sol en uno de sus focos³. Según lo establecido por la segunda ley de Kepler, el radio vector que une el Sol con la Tierra barre áreas iguales en tiempos iguales; lo que supone que, cuando la Tierra está más cerca del Sol (perihelio), su movimiento de traslación es más rápido que cuando está más lejos (afelio). Y esto se mantiene en el resto de la órbita, variando la velocidad orbital en función de la distancia. Este efecto se ilustra de forma esquemática en la figura siguiente, en la que las áreas azul y naranja representan el movimiento de la Tierra en un mismo intervalo de tiempo cerca del perihelio y del afelio, respectivamente.

La excentricidad de la órbita terrestre es pequeña, por lo que la velocidad no varía mucho durante el año, aunque sí lo suficiente para que su efecto sea apreciable. Por ejemplo, como el perihelio se produce a primeros de enero y el afelio a primeros de julio, el otoño y el invierno duran unos 7,5 días menos que la primavera y el verano del hemisferio boreal.

Para evitar esta irregularidad, se “inventa” un *sol ficticio*, que recorre la eclíptica —intersección del plano de la órbita terrestre con la esfera celeste— con velocidad angular constante y que coincide con el Sol en el perihelio y en el afelio. Sin embargo, esto no es suficiente para evitar la falta de uniformidad de los días a lo largo del año. La eclíptica está inclinada unos $23,5^\circ$ respecto al ecuador (la oblicuidad ϵ), inclinación que es la causa de las estaciones del año, como se ilustra en la figura 2.

³ Sería más preciso decir que es el sistema Tierra-Luna el que orbita alrededor del baricentro del sistema solar, pero en este contexto es suficiente con hablar sólo de la Tierra y el Sol.

Debido a la oblicuidad de la eclíptica, la proyección del sol ficticio sobre el ecuador no varía de forma constante, aunque su movimiento en la eclíptica sí sea uniforme; es decir, el horario del sol ficticio no varía de forma regular, por lo que la duración de los días (y de los segundos) sigue siendo variable.

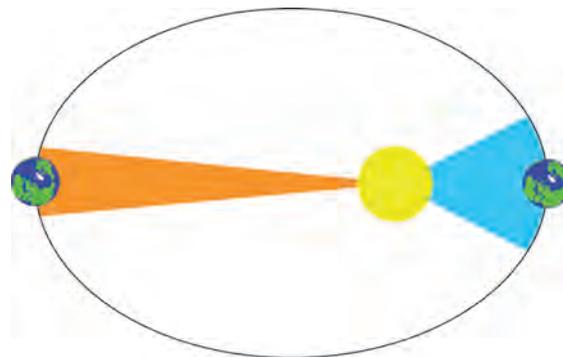


FIGURA 1

Es necesario recurrir a un nuevo sol que denominamos *sol medio*, sol ideal que recorre el ecuador con movimiento horario constante y que coincide con el sol ficticio en los equinoccios. El sol medio es la referencia de la escala *tiempo solar medio*, o simplemente *tiempo medio*, que también se denomina *tiempo civil*. Durante muchos años fue la escala utilizada para medir el tiempo y para definir el segundo como “la ochenta y seis mil cuatrocientasava parte del día solar medio”.

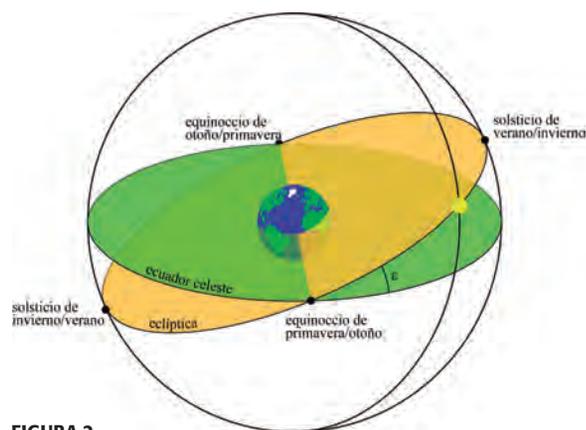


FIGURA 2

El día medio (o civil) comienza con el paso del sol medio por el meridiano inferior del lugar, de forma que las cero horas coinciden con la medianoche. Por tanto, la hora de tiempo medio es el horario del sol medio convertido en horas



Delegados de los países participantes en la Conferencia Internacional del Meridiano. Enmarcado en rojo, el ministro plenipotenciario español, el escritor y diplomático Juan Valera. La legación española la completaban el CF Emilio Ruiz del Árbol, agregado naval, y el TN Juan Pastorín, no identificados. Fotografía: Biblioteca Digitale dell'Archiginnasio.



Patrón atómico de haz de cesio. El ROA cuenta en la actualidad con seis de estos patrones y dos máseres de hidrógeno activo

(dividido por 15), más 12 horas. Así definido, el tiempo medio o tiempo civil depende del meridiano desde el que se cuenta el horario del sol medio, el meridiano del lugar. Es por tanto un tiempo local, de forma que dos lugares con longitudes diferentes tendrán, en el mismo instante, tiempos medios distintos.

El que cada ciudad utilizase una hora distinta se convirtió en un problema serio con la aparición de nuevas tecnologías en la primera mitad del siglo XIX, en particular el ferrocarril y el telégrafo. Para remediarlo, en 1884 se celebró en Washington la “Conferencia internacional para la adopción de un meridiano origen de longitudes y una hora cosmopolita”, conocida como la Conferencia Internacional del Meridiano⁴. Entre otras resoluciones, en ella se acordó adoptar el meridiano de Greenwich como meridiano cero⁵ y el tiempo medio en dicho meridiano como la hora de referencia mundial⁶.

4 En esta conferencia participaron 26 naciones. España votó a favor del meridiano de Greenwich, invocando el compromiso previo adquirido por el Reino Unido de adoptar el sistema métrico decimal.

5 En España, el meridiano de Greenwich sustituyó al de San Fernando como origen de longitudes en la cartografía náutica, por Real Decreto de 3 de abril de 1907, publicado en la Gazeta de Madrid de 6 de abril. El Almanaque Náutico para 1910 fue el primero referido al nuevo meridiano.

6 El tiempo medio del meridiano de Greenwich se adoptó en España para usos civiles a partir del 1 de enero de 1901, por Real Decreto de 26 de julio de 1900, publicado en la Gazeta de Madrid de 28 de julio. Esta disposición también establece que las cero horas corresponden al instante de la media noche, en lugar del mediodía como hasta entonces.

Al tiempo medio de Greenwich se le denominó Tiempo Universal, UT⁷, iniciales de *Universal Time*. Aunque con frecuencia se utiliza GMT (*Greenwich Mean Time*) para referirse al UT, esta denominación está desaconsejada por la Unión Astronómica Internacional desde la Asamblea General de 1928.

TIEMPO ATÓMICO. TAI Y UTC

A pesar de todos los esfuerzos, el UT no es una escala de tiempo uniforme, ya que, aunque está libre de las irregularidades debidas al movimiento de traslación de la Tierra, sigue ligada a su rotación, que no es constante. La Tierra no gira a una velocidad constante alrededor de su eje, ni este eje es siempre el mismo. Las causas son varias y no es posible saber de antemano cuál es la velocidad real de rotación, sino que se conoce a posteriori tras las correspondientes observaciones. Actualmente la Tierra tiene tendencia a frenarse, debido fundamentalmente a las mareas.

Por tanto, el segundo definido como “1 día solar medio/86.400” no representa siempre el mismo período de tiempo y no sirve como unidad de medida. La única forma de evitar esta falta de uniformidad es prescindir de la Tierra como reloj y buscar una forma de medir el tiempo que no esté sometida a variaciones.

La solución la dieron los relojes atómicos, que permiten reproducir en laboratorio un intervalo de tiempo constante. En base a ellos, en 1967 se definió el segundo del Sistema Internacional como la *duración de 9.192.631.770 períodos de la radiación correspondiente a la transición entre los dos niveles hiperfinos del estado base del átomo de Cesio-133*. El número anterior no es caprichoso, sino que se escogió de forma que hubiese continuidad con las anteriores definiciones del segundo⁸.

Se define entonces una nueva escala, el Tiempo Atómico Internacional, TAI⁹, cuya unidad fundamental es el segundo

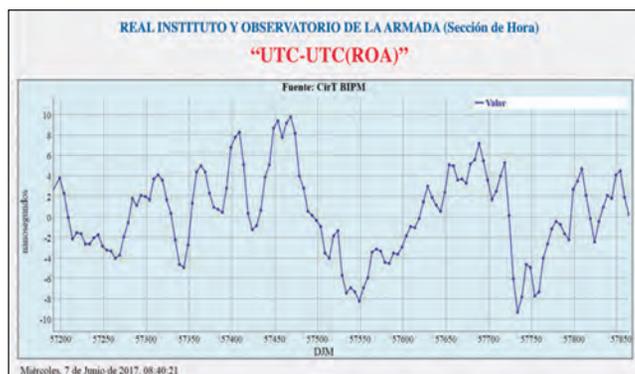
7 Al hablar de UT en realidad nos referimos a UT1, que es la escala resultante de corregir UT0 tiempo medio obtenido directamente de la observación por el desplazamiento del polo sobre la superficie terrestre. La escala UT2, regularización de UT1 por correcciones periódicas, está en desuso.

8 La falta de uniformidad del UT era conocida antes de la invención del reloj atómico en 1955. Para remediarla se recurrió a partir de 1952 al Tiempo de Efemérides, escala ideal desligada de la rotación terrestre cuya unidad de tiempo, el segundo, se definió en 1956 estableciendo que el año trópico de 1900 duró 31.556.925,9747 segundos.

9 Las siglas TAI vienen de las iniciales del nombre francés: Temps Atomique International

definido anteriormente. El TAI sí es una escala de tiempo uniforme, que se realiza con los datos de relojes atómicos de laboratorios de tiempo de todo el mundo. Dicho de otra forma, un segundo TAI siempre dura lo mismo, mientras que un segundo UT unas veces es más largo que otras.

Pero nuestra vida diaria sigue regulada por el Sol y, para poder situarse por medios astronómicos, el navegante necesita saber cómo está orientada la Tierra en cada momento (cuánto le falta al Sol para pasar por el meridiano de Greenwich), y esta orientación la da el UT. Para no prescindir del UT se creó el Tiempo Universal Coordinado, UTC¹⁰, al que se obliga a no diferir del UT en más de 0,9 segundos de la forma que se describe más adelante. La escala UTC tiene la misma unidad que el TAI (el segundo del SI), por lo que un reloj de UTC ni atrasa ni adelanta con respecto a uno de TAI.



Diferencia entre las escalas UTC y UTC(ROA)

UTC es el tiempo de referencia mundial, de forma que la hora de nuestros relojes es UTC más o menos un número entero de horas, salvo algunos países que no siguen esta norma. En España llevamos UTC + 1 (UTC en Canarias) en horario de invierno y UTC + 2 (UTC + 1 en Canarias) en horario de verano.

En el último tercio del siglo XX, el Real Instituto y Observatorio de la Armada fue capaz de dar el salto y pasar del tiempo astronómico al atómico, adquiriendo los dos primeros relojes atómicos en 1972. Dos años más tarde, se inició la escala UTC(ROA), que como se ha comentado al principio es la referencia de la hora española.

¹⁰ Aquí, las siglas usadas internacionalmente no corresponden ni al nombre inglés de la escala, Coordinated Universal Time, ni al francés, Temps Universel Coordonné, sino que se prefirió añadir la C a UT, para mantener claramente la relación con el Tiempo Universal.

Para realizar la escala UTC(ROA), el Real Instituto y Observatorio de la Armada cuenta actualmente con seis patrones atómicos de Cesio y dos Máseres de Hidrógeno activos, con los que se consigue que dicha escala difiera unos pocos nanosegundos de la escala UTC, que se realiza en la Sección de Tiempo del Buró Internacional de Pesas y Medidas de París con la contribución de los relojes atómicos de unos 75 países. La bondad de la escala generada en el ROA, junto con las técnicas de transferencia de tiempo de que dispone (TWSTFT y GNSS), hacen que este laboratorio se encuentre entre los diez primeros del mundo en lo que a realización práctica de la escala UTC propia se refiere.

Para mantener la diferencia entre UT y UTC inferior a 0,9 segundos, cuando es necesario se introduce un *segundo intercalar*¹¹ en el UTC (adelantando o atrasando la escala), como sucedió el pasado 31 de diciembre. Por tanto, podría decirse que la finalidad de los segundos intercalares es poner en hora nuestros relojes con el Sol. Lo único que se hace es cambiar el origen a partir del cual contamos el UTC; la escala sigue siendo tan uniforme como el TAI, aunque difieren en un número entero de segundos.

Los segundos intercalares se iniciaron en 1972 y se introducen preferentemente los días 30 de junio o 31 de diciembre. Como segunda opción, se utilizan el 31 de marzo o el 30 de septiembre.

UT, UTC Y EL NAVEGANTE

La necesidad de calcular la situación en alta mar fue uno de los aspectos que más impulsaron el estudio del tiempo. Y a pesar de las modernas técnicas GNSS para obtener la situación en la mar, la Organización Marítima Internacional sigue exigiendo que los marineros sepan situarse por observaciones astronómicas y que todos los buques que realicen navegaciones oceánicas se hagan a la mar provistos de sextante, cronómetro y aquellas publicaciones náuticas necesarias en navegación astronómica.

Sin duda que, hoy en día, el que más se beneficia de la escala UTC es el navegante que practica la navegación astronómica, ya que necesita saber el UT, argumento de entrada en el Almanaque Náutico, para poder situarse en la mar por medio de los astros.

¹¹ En ocasiones se emplea incorrectamente la denominación "segundo bisiesto"; se trata de una mala traducción del término inglés leap second y no debe utilizarse.



El nuevo edificio del Laboratorio de Hora, que entrará en servicio en los próximos meses.

Con el actual sistema de segundos intercalares, el error que se comete al entrar en el Almanaque con el UTC, en lugar de con el UT, es muy pequeño. Un error de un segundo en el tiempo de las observaciones se traduce en un error de quince segundos en la longitud calculada, un cuarto de minuto de arco. Como no se permite que el UTC se separe más de 0,9 segundos del UT, el error cometido en la longitud será 0,2 minutos en el peor de los casos, diferencia totalmente asumible, máxime si tenemos en cuenta que la hora de la observación la mediremos al segundo¹².

De lo anterior se desprende que, a efectos de navegación astronómica, se puede tomar UTC como UT mientras se mantenga el sistema actual de segundos intercalares.

¿HASTA CUÁNDO LOS SEGUNDOS INTERCALARES?

La introducción de segundos intercalares en la escala UTC se viene cuestionando desde principios de siglo y es normal la aparición en los medios de comunicación de noticias alarmistas sobre las consecuencias negativas que pueden

¹² Las diferencias UT – UTC pueden obtenerse de los Bulletin A del International Earth Rotation and Reference Systems Service (IERS). <http://www.iers.org/IERS/EN/Publications/Bulletins/bulletins.html>

tener cuando se introducen, como el colapso de los sistemas operativos Unix, retrasos en los vuelos por fallos de sistemas informáticos o problemas con algunos navegadores.

En realidad son muchos los partidarios de dejar que el UT se separe libremente del UTC y suprimir los segundos intercalares, debido a los problemas que plantea su introducción, el coste en recursos, sobre todo humanos, y la posibilidad de cometer errores.

Probablemente, la única objeción sería a la supresión es conceptual, ya que con ella se perdería la relación entre el tiempo civil y la rotación de la Tierra, en la cual tiene su origen. Pero los efectos negativos reales sobre nuestra vida serían prácticamente nulos; se estima que en los primeros cincuenta años desde la eliminación se acumulará una diferencia aproximada de un minuto, que es irrelevante desde el punto de vista práctico. Los únicos realmente afectados serían los marinos que todavía usen la navegación astronómica, aunque pueden articularse soluciones para que su efecto sea el menor posible.

El mantenimiento o la supresión de los segundos intercalares no depende de físicos o astrónomos, sino que es la Unión Internacional de Telecomunicaciones (organismo de la ONU)

la que tiene competencias en este tema. La decisión debió tomarse en la Asamblea de Radiocomunicaciones de 2015, pero los países participantes decidieron posponerla hasta la asamblea de 2023, para asegurar que se tuviesen en cuenta todas las opciones técnicas.

EL FUTURO INMEDIATO

El Laboratorio de Hora del Real Instituto y Observatorio de la Armada contará en breve con unas modernas instalaciones, que entrarán en servicio en los próximos meses. El nuevo edificio está dotado de unos modernos medios tecnológicos y de aislamiento mecánico, térmico y electromagnético, lo que sin duda redundará directamente en beneficio de la estabilidad y exactitud de la escala UTC (ROA). Las nuevas instalaciones están preparadas para albergar los futuros relojes ópticos, con los que se espera contar en un breve plazo y de los que se habla más adelante.

Actualmente está muy avanzada la renovación del Sistema Internacional, en respuesta a las nuevas exigencias científico-tecnológicas que requieren menores incertidumbres de medición en todos los campos. Esta renovación supondrá la redefinición de algunas unidades básicas (masa, temperatura termodinámica, intensidad eléctrica y cantidad de sustancia), pero por el momento no afectará a la actual definición conceptual del segundo, basada en la transición del átomo de Cesio 133.

Esta definición es válida para la mayoría de las aplicaciones industriales, pero las compañías de alta tecnología están demandando cada vez más menores incertidumbres. Este hecho, junto con otros factores, ha supuesto un impulso notable a los esfuerzos que se están realizando para el desarrollo de relojes ópticos, que muy probablemente supondrán a corto plazo (probablemente una decena de años) una redefinición del segundo basada en estas nuevas técnicas.

Los relojes ópticos utilizan la luz en lugar de las microondas de los relojes de Cesio, pero con un concepto de funcionamiento muy similar. En líneas generales, la estabilidad de los relojes atómicos es proporcional a la frecuencia de funcionamiento e inversamente proporcional a la anchura de la transición electrónica. Dado que la luz tiene una frecuencia de aproximadamente 10¹⁵ Hz -aproximadamente 100.000 veces mayor que la de las microondas- los relojes basados en transiciones realizadas en frecuencias ópticas, en lugar de microondas, deberían ser mucho más estables y exactos que los actuales en los que está basada la definición del segundo.

A diferencia de los patrones de Cesio, de los que hay un mercado relativamente grande y que son fáciles de adquirir, los relojes ópticos son actualmente prototipos en fase de desarrollo y probablemente no lleguen al nivel comercial de los de Cesio. El Real Instituto y Observatorio de la Armada, al igual que sucediera en los años setenta del siglo pasado, es consciente de la importancia y relevancia de este cambio en la forma de medir el tiempo, y ya ha iniciado los primeros pasos para adentrarse en esta nueva técnica.

RECUPERACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL ROBLE ENANO DEL MONTE PINDO MEDIANTE CULTIVO IN VITRO

San José MC, Martínez MT, Cernadas MJ, Bouza L, Corredoira E

Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Santiago de Compostela, España

RESUMEN

La difícil accesibilidad del Monte Pindo ha permitido la conservación de un conjunto natural único en el que podemos destacar la presencia del roble enano (*Quercus lusitanica* Lam.). Su singular distribución geográfica, así como su reducida presencia hace que haya sido considerada como especie amenazada. Su difícil conservación in situ, aconseja el empleo de otros métodos, como la biotecnología. Las técnicas de cultivo in vitro ofrecen una vía alternativa para la conservación del roble enano. La proliferación de yemas axilares constituye un método eficaz para la propagación de esta especie, facilitando la obtención de un gran número de plantas que pueden servir para la restauración de los ecosistemas amenazados, ayudando a su preservación.

El **Monte Pindo** es un macizo granítico cuya cúspide (A Moa) alcanza los 627 m de altura. Se encuentra situado en el ayuntamiento coruñés de Carnota formando un espacio natural con la playa de Carnota, denominado Carnota-Monte Pindo, catalogado como Lugar de Importancia Comunitaria e incluido en la Red Natura 2000. Este espacio natural tiene una superficie de 4.629 ha y se encuentra en los municipios de Carnota, Mazaricos, Cee y Dumbria, entre las rías de Corcubión y la de Muros y Noya. Los historiadores denominaron a este monte el Olimpo Sagrado de los Celtas. La particular geomorfología del Monte Pindo ha inspirado gran cantidad de historias y leyendas de deidades, esculturas, o monstruos y gigantes míticos. De entre todas estas leyendas merece especial atención la que sitúa el enterramiento de la reina Lupa en estos montes (Alonso Romero 1983)

El Monte Pindo tiene varios castillos, castros, restos de ermitas y cuevas de criaturas mágicas. En su cumbre está la Pedra

da Moa con "pías" (bañeras naturales), donde se cree que se hacían rituales celtas. Y un poco más abajo esta la cueva de A Ermida, donde estaba una iglesia de la que se ha descubierto una antigua inscripción. Se cree que está relacionada con una capilla del siglo XII. En el siglo X, Sisnado (obispo de Iria Flavia) ordenó la construcción del castillo de San Xurxo en los límites del monte como protección contra los ataques de los piratas vikingos. En él habitaron varias familias nobles de Galicia hasta que el castillo fue destruido en el año 1.467 durante la Revuelta Irmandiña.

En este entorno se encontraban otros dos castillos, pero no se conservan restos materiales determinantes de ellos, ni documentación analizable, más que una inscripción en latín en una piedra aislada:

"Reis, bispos, presbíteros, todos por poderes recibidos de Deus, excomulgaron aquí este Castelo"

Esta inscripción hace referencia a la excomunión que en 1.130 lanzó Diego Gelmírez, arzobispo de Santiago, contra el conde de Traba, por tener prisionero en su castillo al arcediano de Trastámara.

Aparte de sus valores simbólicos y geológicos, presenta también importantes valores ecológicos. La difícil accesibilidad del Monte Pindo ha permitido la conservación durante siglos de un conjunto natural único, con especies raramente visibles en otras partes del mundo. En el inventario de especies que realizaron los miembros de la Asociación Monte Pindo Parque Natural, encontraron 650 ejemplares, de los que unos 100 están protegidos por algún tipo de legislación. La joya de esta corona es el denominado "roble enano" (*Quercus lusitanica*), que se ha convertido en símbolo de la biodiversidad de la

zona. Esta especie está distribuida por el sur de la Península Ibérica y el norte de Marruecos pero tiene en este monte su único asentamiento en territorio gallego. En esta Comunidad existe una pequeña población aislada y cuasi-residual a las faldas del Monte Pindo, situándose a 500 km de la población más cercana de la misma especie. La presencia de *Q. lusitanica* en el Pindo se reduce a pequeñas manchas aisladas. Esta singular distribución geográfica, así como su reducida presencia ha motivado que esta especie fuese incorporada desde 2008 al Catálogo Gallego de Especies Amenazadas, encontrándose también en la Lista Roja de Andalucía y en el Catálogo de Especies Amenazadas de Extremadura. Además del roble enano existen en el Monte Pindo un total de 7 especies de plantas protegidas en el Catálogo Gallego de Especies Amenazadas: 6 vasculares y 1 briofito, entre las que cabe destacar el lirio de monte (*Iris boissieri Henriq*), una planta endémica del noroeste peninsular que tiene uno de sus hábitats en el Monte Pindo, además de en las sierras de O Xurés y O Courel y que ha sido catalogada como en peligro de extinción a nivel mundial por la Unión Internacional de Conservación de La Naturaleza (IUCN).

En los últimos años han aumentado las agresiones contra el espacio donde crece el roble enano. Las numerosas batidas de cazadores, el acceso indiscriminado de motos y quads y, los numerosos incendios que se han producido, siendo especialmente devastador el acaecido en el 2013 que arrasó, según las estimaciones, alrededor de 9 hectáreas, han disminuido notablemente el número de individuos de esta especie. En la actualidad el Monte Pindo y su entorno natural está abandonado y abocado a un progresivo deterioro.

Los principales problemas medioambientales y amenazas encontradas en la zona en la que se localiza la población de *Q. lusitanica* son:

- . Deforestación causada por los frecuentes incendios forestales que ha sufrido la zona del Monte Pindo y alrededores durante los últimos años
- . Desprotección del suelo y erosión
- . Peligro de la biodiversidad en algunas zonas, propiciado por la presión cinegética
- . Vandalismo, campismo agresivo, incursiones con vehículos motorizados

Todo ello contribuye a la desaparición de la fauna y flora de la zona, y en concreto estos problemas suponen una amenaza directa a la supervivencia del *Q. lusitanica*, de ahí la necesidad

imperiosa de mantener a resguardo su germoplasma fuera del propio hábitat (conservación *ex situ*) ya que en el caso de un desastre natural se dispondría de un material protegido y de calidad almacenado en el laboratorio con el que se podría realizar la posterior reimplantación de la especie en su hábitat natural.

QUERCUSLUSITANICA LAMARCK (FAG ACEAE)

El roble enano pertenece a la familia Fagaceae, la cual está formada por 7 géneros y alrededor de 700 especies, repartidas principalmente por zonas templadas y cálidas del hemisferio norte. *Quercuslusitanica* fue descrito por primera vez por Jean-Baptiste Lamarck y publicado en Encyclopédie Méthodique Botanique en 1785. Arbusto de hasta 3-4 m de altura, aunque normalmente mide 0.5-2 m, con hojas alternas, simples, que se mantienen secas sobre el árbol la mayor parte del invierno. Florece entre abril y mayo. Fruto en aquenio (bellotas) de 10-15 mm, con la base cubierta por una estructura escamosa y dura. Se cría en los matorrales y colinas de clima suave, frecuentemente en terrenos silíceos arenosos o pedregosos hasta unos 600 m de altitud (López 2014).

Además de su valor ecológico, el extracto de las semillas de esta especie ha demostrado un efecto inhibitorio de la replicación del virus del dengue (tipo 2) tanto mediante el cultivo de células convencional, como mediante técnicas proteómicas. (Muliawan et al. 2006). El extracto se utiliza también en diversos preparados para la piel que son objeto de patente.

CONSERVACIÓN DEL ROBLE ENANO

Actualmente existe una clara sensibilización de los habitantes de la zona hacia la protección y conservación del patrimonio, tanto por su riqueza geológica, faunística, botánica, arqueológica, así como por su belleza paisajística, todo ello llevó a la creación de la Asociación Monte Pindo que reivindica la creación de un Parque Natural en esta área.

En la conservación de especies silvestres, el enfoque tradicional es la conservación *in situ*, en su propio hábitat. Sin embargo, cada vez se acepta en mayor grado que las técnicas de conservación *ex situ* pueden ser utilizadas eficientemente para complementar los métodos *in situ*, y que incluso pueden representar la única opción para la conservación de ciertas especies raras, amenazadas o en peligro de extinción. En este sentido, las herramientas de la biotecnología moderna

están siendo cada vez más aplicadas para la caracterización de la diversidad vegetal e indudablemente tienen un papel principal asistiendo a los programas de conservación de plantas. Entre estas herramientas destaca el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Esta técnica tiene cada vez más impacto en las estrategias de conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales, es el caso de las especies/variedades que deben de ser propagadas vegetativamente o que tienen semillas heterodoxas o recalcitrantes, como es el caso del *Q. lusitanica*, cuya expectativa de supervivencia en bancos de semillas convencionales es muy corta debido a su estricta necesidad de humedad. Además la conservación *in situ* por sí sola no es suficiente para salvar las especies en peligro de extinción ya que aunque aporta importantes opciones de conservación, el germoplasma mantenido de esta manera corre el riesgo de sufrir ataques de patógenos, tornados, incendios, etc., que ponen en riesgo su supervivencia. Disponer de copias de germoplasma natural a resguardo de peligros reales es una alternativa práctica y aceptada hoy día de forma general. Pero para ello es necesario aplicar las nuevas tecnologías disponibles, de las cuales la regeneración de la especie vegetal en cuestión mediante el cultivo *in vitro* es una herramienta fundamental. En cualquier momento, los propágulos mantenidos *in vitro* pueden rescatarse de su almacenamiento, regenerar plantas completas y reponer o aumentar la población natural de la especie objeto de estudio, en este caso particular el roble enano.

Las técnicas biotecnológicas representan una sustancial mejora sobre los métodos de conservación tradicionales y proveen medios extras para la conservación de la biodiversidad (Fay 1992). Estas técnicas son utilizadas para incrementar rápidamente el número de individuos en especies con problemas reproductivos y/o con poblaciones muy reducidas. Se obtiene así un material de gran valor para la investigación, colecciones vivas, para reducir la presión de las colecciones botánicas en las poblaciones naturales y, si se considera oportuno, para los programas de reintroducción (González-Benito y Martín 2011). La micropropagación de plantas tiene una gran aplicación en especies forestales, que son cultivadas *in vitro* desde 1950 (Bonga y von Aderkas 1992). El método más ampliamente utilizado es el cultivo de yemas axilares que garantizan la uniformidad genética del material obtenido. Aunque estas técnicas han sido utilizadas para la conservación de diversas especies de roble (Vieitez et al. 2012), hasta la fecha, ninguna hace referencia a esta emblemática especie (*Quercus lusitanica*). Un protocolo eficaz de micropropagación es un método efectivo y rápido para la propagación clonal y conservación de especies en peligro,

y parece el único método efectivo para la multiplicación y conservación del roble enano.

ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS *IN VITRO*

Se recogieron ramas de árboles adultos (20-30 años) que habían sobrevivido al incendio del 2013 y en las que se podía observar el desarrollo de nuevos brotes. Las ramas, una vez desprovistas de las hojas, son cortadas en segmentos de entre 20-25 cm y desinfectados superficialmente con una solución fungicida (3,5 g/l) durante 2 horas. Una vez secos, se sitúan en posición vertical en bandejas con perlita humedecida en una cámara de crecimiento con condiciones de luz, temperatura y humedad controladas (16 h de fotoperiodo con una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 90%). Al cabo de 2-3 semanas, se puede observar el desarrollo de nuevos brotes que serán utilizados como la fuente de los explantos iniciales para el establecimiento de los cultivos de *Q. lusitanica* (Fig. 1A).

Los brotes desarrollados en la cámara de crecimiento son desprovistos de sus hojas y esterilizados superficialmente mediante la inmersión en una solución de cloro libre al 0.3% (pastillas de cloro Millipore®) durante 3 minutos, siendo posteriormente aclarados con agua estéril (3 lavados). Se procede a continuación al aislamiento de los ápices y nudos (5-8 mm) que se sitúan en posición vertical en tubos de cultivo de 30 x 150 mm conteniendo 25 ml del medio de establecimiento. Como medio de cultivo se utilizó la formulación de Gresshoff y Doy (GD, 1972) suplementado con 0.5 mg/l de la citoquinina 6-benciladenina (BA), 30 g/l de sacarosa y 6.5 g/l de agar Vitro (Pronadisa). El pH del medio fue ajustado a 5.6 antes de su esterilización en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Para evitar el contacto con los fenoles exudados al medio, los explantos son transferidos al lado opuesto del tubo un día después de su siembra. Cada dos semanas se transfieren a medio fresco de igual composición y al cabo de 8 semanas se recogen los datos. Mediante esta técnica se consiguió el establecimiento *in vitro* de brotes axilares de roble enano con unas tasas de supervivencia que varían en función del tipo de explanto, obteniendo una mejor respuesta con los explantos apicales (44%) que con los nodales (29%). La contaminación fue muy baja con valores inferiores al 10%

MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES AXILARES

La fase de establecimiento en el roble enano fue de dos meses, al cabo de los cuales se apreciaba un desarrollo estable de

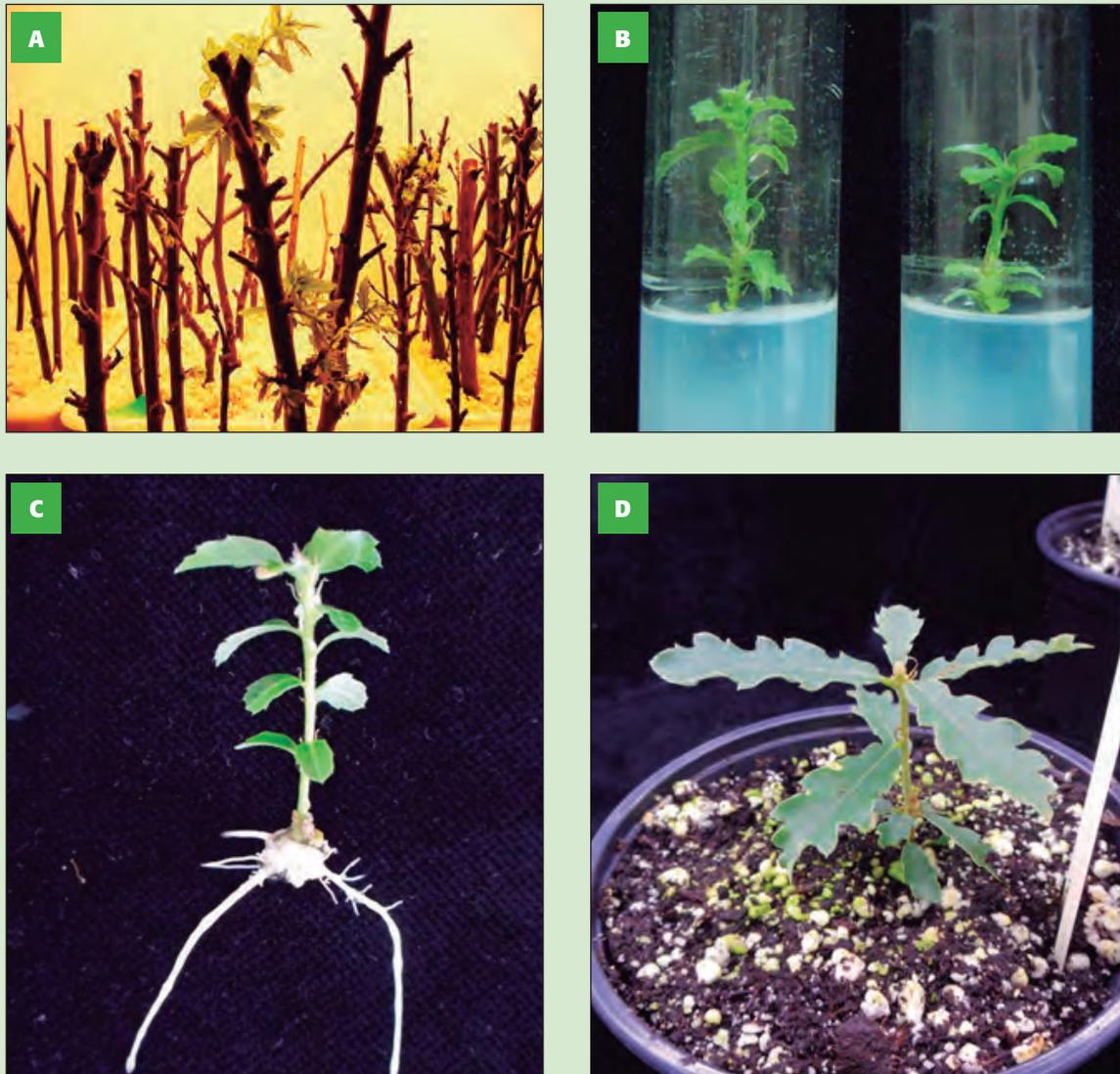


Figura 1. Propagación *in vitro* de *Quercus lusitanica* Lam. (roble enano) mediante la proliferación de yemas axilares de origen adulto. A. Desarrollo de brotes en la cámara de crecimiento. B. Fase de multiplicación en medio WPM con 0.1 mg/l de BA. C. Enraizamiento de los brotes en WPM con los macronutrientes reducidos a la mitad suplementado con 2 mg/l de AIB. D. Aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro*.

los brotes *in vitro*. Brotes mayores de 0.5 cm son utilizados para iniciar la fase de multiplicación en la cual se efectuaron diversos ensayos con el fin de determinar las mejores condiciones de proliferación para *Q. lusitanica*. Como medio de cultivo se ensayaron las formulaciones GD, WPM (Lloyd y McCown 1980) y Murashige y Skoog (1962) con los nitratos reducidos a la mitad (MS $\frac{1}{2}$ n), todas ellas suplementadas con 0.1 mg/l de BA, 30 g/l de sacarosa y 6.5 g/l de agar Vitro. En todos los medios se utilizaron explantos basales y apicales de entre 0.5 y 1 cm que fueron situados en posición vertical en tubos de cultivo de 20 x 150 mm que contenían 15 ml del medio de multiplicación.

La selección del medio de cultivo es de vital importancia para el éxito de la micropropagación. En el caso del roble enano, ambos el medio de cultivo y el tipo de explanto tuvieron una gran influencia en las tasas de multiplicación. Aunque GD ha sido ampliamente utilizado para la multiplicación de yemas axilares en diversas especies de *Quercus* (Vieitez et al. 2012), en el roble enano los mejores resultados se obtuvieron al utilizar el medio WPM y los explantos basales. Esta combinación favoreció el desarrollo de un mayor número de brotes (4.0 frente a 2.5 conseguidos con GD y MS $\frac{1}{2}$ n) y una mayor elongación de los mismos (33.0 mm frente a 20 mm con GD y 18.0 mm con MS $\frac{1}{2}$ n) (Fig. 1B). El 100% de los explantos, tanto basales como apicales, respondieron en este medio. Vengadesan y Pijut (2009) también refieren la utilización de este medio para la micropropagación de *Q. rubra*. Las tasas más bajas de multiplicación se obtuvieron al utilizar la formulación MS con los nitratos reducidos a la mitad.

ENRAIZAMIENTO DE LOS BROTES

En la revisión efectuada por Vieitez et al. (2012) se señalan diversos métodos para el enraizamiento de brotes de distintas especies del género *Quercus*, en los que siempre se utiliza una auxina (ácido indol butírico (IBA) o ácido naftalén acético (ANA)), la cual se incorpora al medio, bien en bajas concentraciones (1-5 mg/l) durante periodos de 7 a 10 días o bien en concentraciones más elevadas (20-25 mg/l) durante periodos de tiempo más cortos (24-48 h). En el caso del roble enano, los mejores resultados se obtuvieron al incorporar al medio de cultivo (WPM con los macronutrientes reducidos a la mitad) 3 mg/l de AIB durante 7 días. Los brotes son posteriormente transferidos a un medio de igual composición sin auxina durante otras 3 semanas para el desarrollo de las raíces. Con este tratamiento un 75% de los brotes formaron raíces (Fig. 1C).

Cabe señalar que los porcentajes de enraizamiento obtenido en este trabajo con brotes desarrollados *in vitro*, son muy superiores a los conseguidos por Fernández Rodríguez et al. (2005) en estacas tratadas con una solución del 1-2% de AIB. Estos autores observaron grandes diferencias entre los distintos genotipos cuyos valores de enraizamiento oscilan entre el 3.3 y el 40%.

ACLIMATACIÓN DE LOS BROTES ENRAIZADOS

Los brotes enraizados fueron removidos del medio de enraizamiento y se procedió al lavado de las raíces con agua para eliminar los posibles restos de agar, transfiriéndolos a continuación a contenedores con una mezcla de turba y perlita (2:1) y situándolos en una cámara de crecimiento con una humedad relativa del 90%, temperatura de 25°C y un fotoperiodo de 16 h (90-100 μ mol m $^{-2}$ s $^{-1}$). Las plantas son fertilizadas semanalmente con 10 ml de la solución de Hoagland (Hoagland y Arnon 1941) y permanecen en la cámara de crecimiento durante 4 semanas, siendo posteriormente transferidas al invernadero con porcentajes de supervivencia superiores al 60% (Fig. 1D).

CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado un protocolo para la micropropagación de *Quercus lusitanica* mediante la proliferación de yemas axilares y posterior enraizamiento y aclimatación de las plantas obtenidas *in vitro*. Estos procesos facilitarán la mejora, conservación y propagación en masa de esta especie amenazada y la restauración de sus ecosistemas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. EV Carral por el suministro del material vegetal para la realización de los trabajos. Igualmente agradecen a JC Suarez y N Blázquez por su valiosa asistencia técnica.

REFERENCIAS

1. Alonso Romero F (1983) La leyenda de la reina Lupa en los montes del Pindo. Cuadernos de Estudios gallegos 34: 227-267
2. Bonga JM, von Aderkas P (1992) In vitro culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 236
3. Fay M (1992) Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. In Vitro Cell Dev-Plant 28: 1-4
4. Fernández Rodríguez R, et al. (2005) Identificación mediante técnicas moleculares de *Quercus lusitanica* Lam. y estudio de técnicas de propagación como base para la conservación de esta especie. 5º Congreso Forestal Nacional. Viseu, Portugal
5. González-Benito ME, Martín C (2011) In vitro preservation of Spanish biodiversity. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 47: 46-54
6. Gresshoff PM, Doy CH (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. Planta 107: 161-170
7. Hoagland DR, Arnon DI (1941) The water culture method for growing plants without soil. Miscellaneous Publications nº 354. Circular of California Agricultural Experimental Station 347: 461
8. Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Comb Proc Int Plant Prop Soc 30: 421-427
9. López G (2014) Los árboles y arbustos de la Península Ibérica. Mundi-Prensa. Madrid
10. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497
11. Muliawan SY, et al. (2006) Inhibitory potential of *Quercus lusitanica* extract on Dengue virus type 2 replication. Southeast Asian J Trop Med Public Health 37: 132-135
12. Vengadesan G, Pijut PM (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult 97: 141-149
13. Vieitez AM, et al. (2012). Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. Eur J Forest Res 131: 519-539

INN-DAGA: INN-ovación en la adquisición de Datos GeoAmbientales

Belén Rubio, Daniel Rey, Ana Bernabeu, Federico Vilas, Miguel Otero, David Campos

Grupo GEOMA. Dpto. de Geociencias Mariñas e Ordenación do Territorio.
Facultade de Ciencias do Mar. Universidade de Vigo, Spain

RESUMEN

INN-DAGA es una plataforma multipropósito diseñada por el grupo de Geología Marina y Ambiental (GEOMA) de la Universidad de Vigo, para la realización de trabajos oceanográficos en zonas costeras. Desarrollada sobre una embarcación semirrígida de 8,5 m de eslora permite operar con seguridad en áreas (zonas rocosas, portuarias, etc.) donde otros buques oceanográficos de mayor calado no pueden acceder. La combinación que aporta INN-DAGA en la adquisición *in situ* de datos geofísicos del fondo, datos de columna de agua y muestras, junto con diversas herramientas de procesado e integración en sistemas de información geográfica proporciona una excelente aproximación a las características hidrográficas y geológicas y, en última instancia, es de gran utilidad para la valoración y la toma de decisiones sobre la gestión integral de las zonas costeras.

Palabras clave – *Gestión integrada de zonas costeras (GIZC), herramientas de gestión ambiental*

INTRODUCCIÓN

Las zonas costeras, con una complejidad de interacciones causada por diversos factores, se caracterizan por un gran dinamismo y variabilidad natural intrínseca (Crossland et al., 2005). Esta variabilidad se ha visto incrementada en las últimas décadas como consecuencia de un incremento de la presión antropogénica en estas áreas (Sardá, 2001; Ritcher et al., 2001) con la realización de diversas actuaciones que afectan a la dinámica costera y a la calidad de los sedimentos costeros incrementando su vulnerabilidad. Tal es el caso, por ejemplo, de los numerosos puertos urbanos del mundo donde coexisten y confluyen numerosos usos y

actuaciones y/o conflictos (Pearson et al., 2016): actividades turísticas y deportivas, acuicultura, actividades industriales, dragados, construcciones portuarias, etc., que requieren de una adecuada planificación y gobernabilidad de usos. Dichas actuaciones exigen un control y seguimiento continuo y sistemático, que constituye un paso decisivo para alcanzar una adecuada sostenibilidad dentro del marco de la gestión integrada de zonas costeras (GIZC), principalmente en un país como España en el que el 11% del PIB proviene del turismo y del desarrollo en áreas costeras (DOCE, 2002; Informe UNWTO, 2015). Estos procesos de control exigen, cada vez más, de la creación de nuevas herramientas de adquisición rápida y sistemática de datos y muestras, tanto de los fondos sedimentarios, como de la columna de agua.

La GIZC se ha convertido, por tanto, en uno de los mayores retos medioambientales actuales. Comprender las interacciones de los ecosistemas costeros es un objetivo complejo pero fundamental para científicos y gestores. Por ello, es cada vez más importante en la toma de decisiones y en la GIZC, profundizar en el conocimiento de los aspectos ambientales y socioeconómicos en la costa. Este es, en la actualidad, el objetivo de numerosos programas internacionales, en el que se demandan técnicas avanzadas de exploración y adquisición de datos, como la que aquí se propone.

En este contexto el grupo GEOMA desarrolló INN-DAGA en el marco de los proyectos DRACORE e INNODRAVAL (IPT-310000-2010-17) del Plan Nacional e INN-DAGATOR de la Xunta de Galicia. Nuestro principal objetivo consistía en alcanzar innovación en las operaciones de restauración ambiental de áreas costeras mediante el desarrollo de una plataforma integrada para la caracterización del ambiente marino, que incluyese tanto la caracterización geofísica de

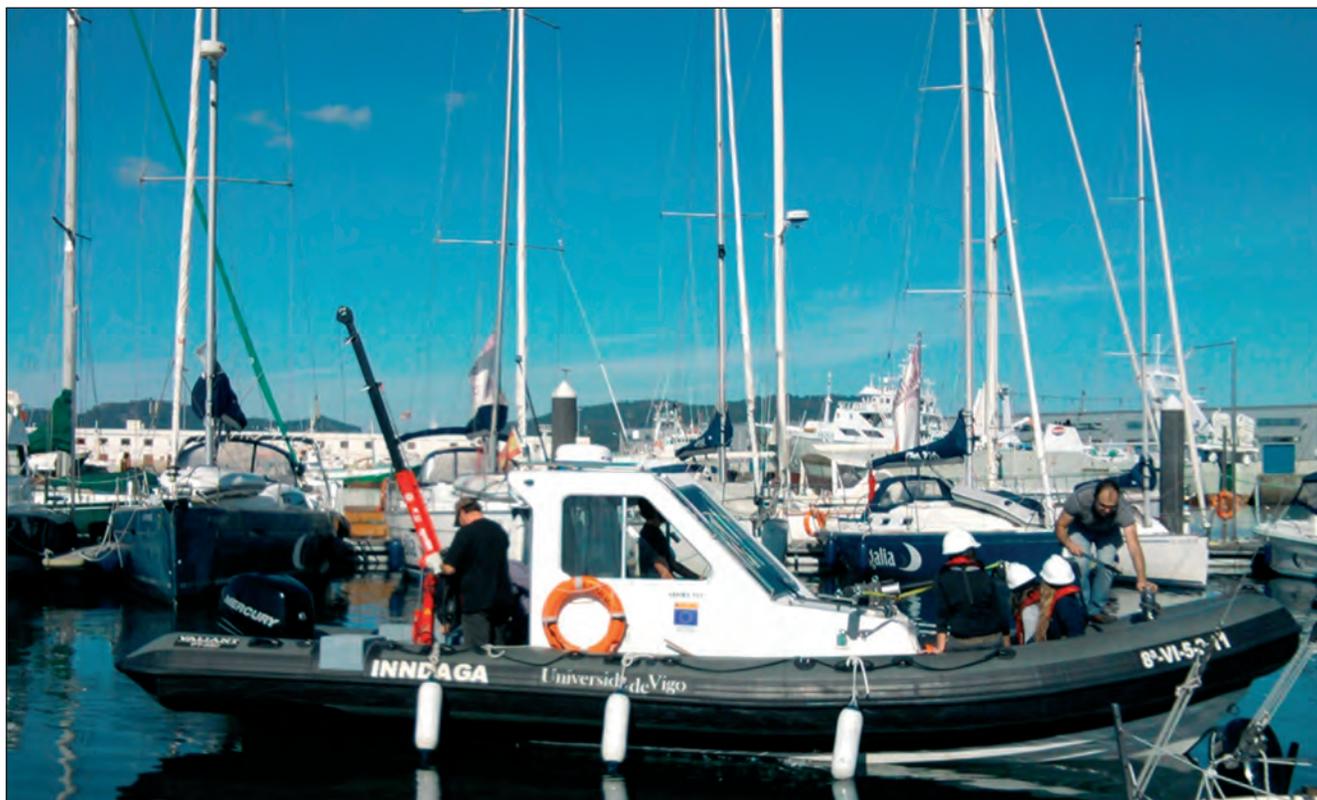


FIGURA 1. Vista general de la embarcación donde se aprecia la cabina y la grúa en popa.

los fondos (batimetría, morfología, obstáculos, etc.), como la caracterización de la columna de agua (temperatura, salinidad, pH, etc.) y el muestreo de aguas y sedimentos. En su origen fue concebida para la monitorización y control de las actuaciones de dragado, tratamiento y recuperación de sedimentos con contaminantes orgánicos e inorgánicos en áreas portuarias y, en la actualidad, su uso se ha extendido a cualquier actividad de investigación o aplicación en áreas costeras.

DESARROLLO Y COMPONENTES DE INNDAGA

Es un prototipo de plataforma de prospección geofísica, oceanográfica y sedimentológica integrada en una embarcación neumática semirrígida de 8,5 m de eslora y 2000 kg de peso (Fig. 1). Dispone de una cabina en proa que facilita la protección de los equipos geofísicos e informáticos. La instalación de un generador Honda 3KVA garantiza autonomía eléctrica (220/12V) a la plataforma. Está equipada con un sistema de propulsión de 250 CV, que le permite una gran flexibilidad de maniobra en áreas donde otras embarcaciones

no pueden acceder, tales como zonas muy próximas a la costa, zonas rocosas, portuarias, etc. Dispone además de una grúa hidráulica abatible de pequeñas dimensiones con cabrestante eléctrico que permite cargar hasta 200 kg de peso y facilita la operación con el instrumental científico de pequeñas dimensiones.

Para la instalación del equipamiento científico se diseñó un sistema de pértiga abatible en tubo redondo de aluminio de 80 mm instalado sobre una cuña de polietileno para fijar el soporte sobre la cabina (Fig. 2a) que remata en un soporte en T para la colocación de las antenas de GPS. Se ha optado por colocarla del lado de babor para favorecer la visualización por el patrón de la embarcación y evitar daños en el equipo en zonas muy someras con rocas aflorantes. Dicha pértiga permite el encaje con los distintos equipos de geofísica, para lo cual se diseñaron diversas piezas ad hoc en cada caso (Fig. 2c,e).

En cuanto al equipamiento científico, está equipada con instrumentación de máxima calidad en el mercado, comprendiendo:

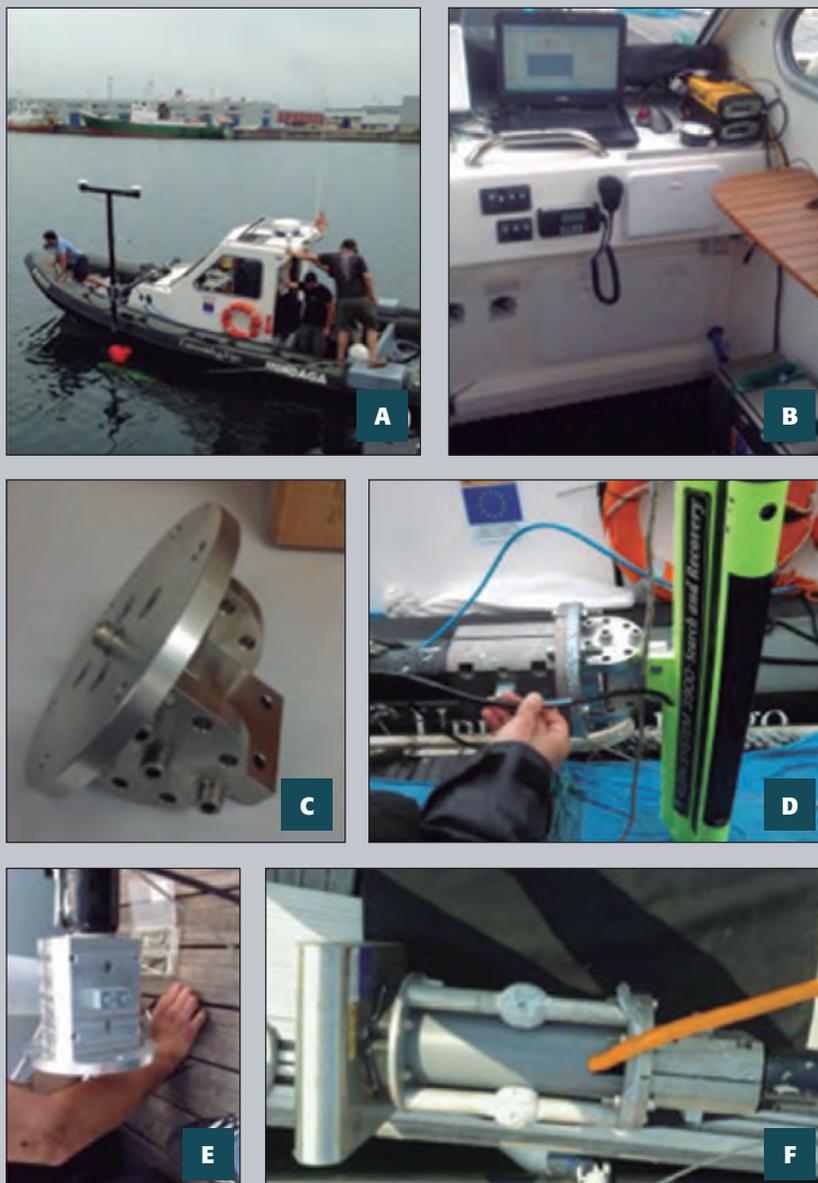


FIGURA 2.

A: Estructura en pértiga abatible colocada sobre cuña de polietileno en la cabina, véase en la estructura en T la disposición de las dos antenas del GPS. Nótese sumergido el sónar de barrido lateral anclado en dicha estructura

B: unidades vectorial y posicional de los GPS en la parte superior derecha de la imagen y unidad de operación del sistema multihaz, bajo la mesa abatible.

C: pieza en acero inoxidable diseñada para colocación en modo fijo del SBL

D: detalle de la pieza conectada al SBL y a la botavara.

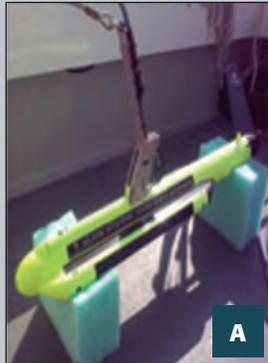
E: detalle de la pieza para anclaje de la sonda paramétrica en la misma pieza.

F: pieza anclada en la botavara y en la sonda paramétrica.

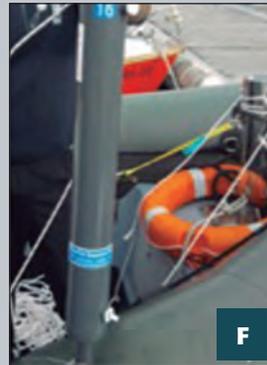
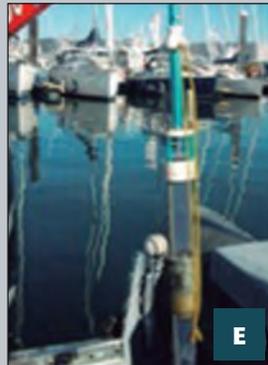
a. Un **sistema de posicionamiento** diferencial (DGPS) y RTK (real time kinematic), con los sistemas TRIMBLE SPS. El sistema está compuesto de un módulo o receptor posicional (SPS852), un receptor vectorial (SPS 552H) y unas antenas (modelo GA 810) (Fig. 2a). El receptor modular SPS852 GNSS, de pequeñas dimensiones, combina la radio y el receptor GPS en una única carcasa (Fig. 2b).

Estos podrán recibir las siguientes señales GPS L1/L2, L2C, GLONASS, SBAS (EGNOS) y OmniSTAR VBS/XP/HP con un sistema de baterías integradas que pueden actuar como sistema de alimentación ininterrumpida (SAI). Su instalación dentro de la cabina del barco, representa un mecanismo de protección. El receptor SPS552H complementa al anterior en un sistema pareado para proporcionar información del rumbo (heading) en

EQUIPOS GEOFÍSICOS



EQUIPOS DE MUESTREO



EQUIPOS OCEANOGRÁFICOS



FIGURA 3. Equipos disponibles en INNDAGA:

- A: sónar de Barrido Lateral
- B: sonda multihaz,
- C: sonda paramétrica
- D: draga,
- E: testificador,
- F: botella Niskin,
- G: CTD,
- H: correntímetro,
- I: sonda multiparamétrica.

proyectos que requieren una orientación precisa, e ideal para aplicaciones dinámicas donde se requiera posición y rumbo. Finalmente, las antenas son idénticas, si bien se instaló hacia proa la conectada al receptor posicional y hacia popa la del receptor vectorial.

- b. Herramientas **geofísicas** tales como el sonar de barrido lateral- SBL (Klein 3900), sonar multihaz (Kongsberg GS +)

y la ecosonda paramétrica (INNOMAR 2000) (Fig. 3a,b,c).

En el ámbito de la geología marina, la exploración de los fondos oceánicos se realiza en gran medida mediante este tipo de métodos indirectos (Michaud et al., 2005). Las técnicas más empleadas son las de las ondas acústicas que son la base de estos equipos. El Sonar de Barrido Lateral (SBL) es un sistema de adquisición

de imágenes acústicas del fondo marino determinado por los siguientes procesos: la generación de la onda acústica en el transductor del sonar, su propagación a través de la columna de agua, su dispersión en el fondo, su propagación de vuelta al transductor y su posterior procesado (Blondel, 2009). El SBL se compone de una unidad de superficie que registra la señal y un pez sumergido con unos sensores compuestos de unas cerámicas piezoeléctricas que transforman la señal eléctrica en una onda acústica, provocando una variación de presión que hace vibrar el medio por el que viaja. En la mayoría de los estudios dicho pez va remolcado, si bien se ha diseñado una pieza para su colocación de modo fijo (Fig. 2c,d) lo que permite asegurar y refinar el posicionamiento.

El sistema batimétrico GeoSwath+ Compact está compuesto de los siguientes módulos: una unidad de cubierta que va alojada en el interior de la cabina (Fig. 2b) y un módulo de sensores, compuesto por: dos transductores, el sensor actitud IMU y un MiniSVS, que va instalado en el soporte tipo botavara anteriormente descrito (Fig. 3a). Los dos transductores van montados en V y operan a la misma frecuencia. El GS+ utiliza un sistema interferométrico, que además de datos batimétricos proporciona una óptima resolución en valores de intensidad reflejada, permitiendo el mapeo de la retrodispersión del fondo (backscatter).

A diferencia de las ecosondas monohaz donde la cobertura se reduce a la proyección sobre el fondo de una línea que es la trayectoria del barco, con la ecosonda multihaz mediante la emisión de múltiples haces se consigue realizar un barrido de varios metros de ancho en el sentido de la navegación. Aunque usan el mismo principio tecnológico, la multihaz es capaz de determinar profundidades en más de un punto del fondo para un solo disparo acústico. En lugar de calcular un valor de profundidad para el punto que se sitúa justo debajo del barco (monohaz) una ecosonda multihaz puede determinar un amplio perfil de profundidades a lo largo de una línea perpendicular al rumbo del barco. Se pueden, por tanto, obtener batimetrías de detalle que permiten cubrir zonas amplias, con gran precisión y rapidez, al garantizar el 100% de la cobertura en el área de estudio.

Estudios recientes (Iacono et al., 2008) demuestran que

las técnicas combinadas de imágenes de barrido lateral con batimetrías de alta resolución son las técnicas que mejores resultados están aportando para una caracterización sedimentológica y morfológica de los fondos marinos.

La ecosonda paramétrica multifrecuencia, con frecuencia primaria de 100 kHz y frecuencias secundarias de 5, 6, 8, 10, 12, 15 kHz, permite la doble función de detección de profundidad y análisis del subsuelo marino (Fig. 3c). Puede operar hasta 400 m de profundidad y con una penetración en el subsuelo de hasta 40m. Para la transmisión y recepción de señales dispone de un transductor de acero inoxidable con tamaño (22x22x10 cm) y peso (25 kg) reducidos, que lo hace óptimo para su instalación en barcos pequeños como INNDA GA. De igual modo se ha diseñado una pieza de acoplamiento para su colocación en la botavara (Fig. 2 e,f,g).

- c. Herramientas de **muestreo de sedimentos y aguas**. Para los sedimentos se dispone de draga tipo Van Veen de 500 ml para la obtención de muestras de sedimentos superficiales (Fig. 3d) y de testificador del tipo UWITEC (Fig. 3e), que combina la gravedad con una ligera succión, para la obtención de testigos de hasta 1 m de longitud. Lo ideal es combinar ambos muestreos que permiten registrar simultáneamente los cambios históricos en el registro sedimentario (ej. contaminación), así como preservar la interfase agua de mar-sedimento. La utilización de camisas de metacrilato resulta muy útil para la visualización de modo instantáneo de las características del sedimento.

Para la toma de muestras de agua se dispone de un sistema de 3 botellas Niskin con capacidad de 2,5 L con un cuerpo en PVC con interior libre de partes metálicas (Fig. ef). Su disposición en cascada, permite, mediante el cierre con mensajeros, muestrear simultáneamente hasta 3 profundidades.

- d. Herramientas **oceanográficas**: CTDs (XRX-620 y SBE 37-SMP Micro CAT), sonda mutiparamétrica (YSI) y correntímetros (Aandera RCM9/Seaguard). Todos los equipos pueden operar entre 1-60 m de profundidad, permiten la obtención simultánea de datos (velocidad y dirección de corrientes, temperatura, salinidad, material en suspensión, presión, oxígeno disuelto, pH) de la columna de agua a diferentes profundidades. Todos ellos

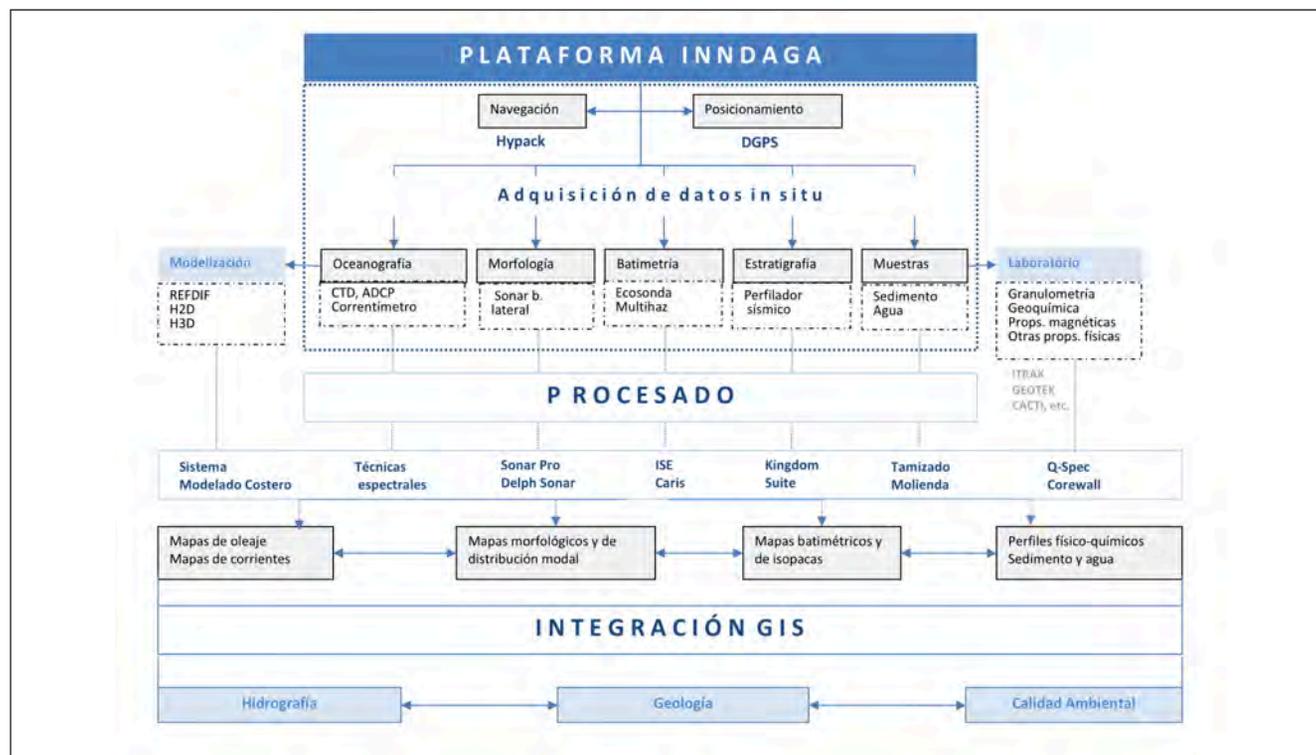


FIGURA 4. Diagrama de flujo que muestra tanto las capacidades de inndaga como la hoja de ruta de su operabilidad en función de las necesidades planteadas en cada tipo de actuación.

son de reducido tamaño y pueden operarse manualmente o con la grúa del barco.

PRINCIPALES APLICACIONES Y GESTIÓN INTEGRADA DE DATOS

Los distintos equipos disponibles en INNDAGA permiten su utilización para las siguientes aplicaciones: a) determinación de la calidad de los fondos sedimentarios, b) realización de batimetrías de muy alta resolución en zonas someras, c) determinación de espesores de unidades sedimentarias, d) caracterización de condiciones oceanográficas en áreas submareales, e) seguimiento y control de calidad en operaciones de dragado, f) evaluación de estabilidad de obras marítimas y movimientos de estructuras/bloques, g) localización y posicionamiento de estructuras sumergidas y de objetos hundidos, entre otras.

Si bien el objetivo último de INNDAGA es la gestión integrada y georreferenciada de datos y muestras adquiridas desde la plataforma. Esto contempla tanto el diseño de los protocolos

de actuación con cada una de las herramientas disponibles en INNDAGA, así como el procesamiento posterior de los datos adquiridos in situ, es decir, a bordo de la embarcación, como en el laboratorio. El diagrama de flujo de la figura 4 representa, a modo de síntesis, todos los pasos a seguir desde la navegación o el posicionamiento de los datos en la embarcación, pasando por la obtención de datos de cada uno de los sensores, así como el tipo de procesamiento de los datos o las muestras con la obtención de distintos productos (mapas, perfiles físico-químicos, etc.).

A modo de ejemplo, para la navegación tomamos datos georreferenciados con el software Hypack mediante un sistema de GPS diferencial (DGPS). En función de las líneas de navegación prediseñadas en el Hypack o puntos de muestreo, se toman diversos tipos de datos in situ. Estos pueden ser muestras físicas, es decir, muestras de sedimentos (ya sean superficiales o testigos) o aguas. O bien pueden ser datos oceanográficos o geofísicos, adquiridos con los equipos anteriormente descritos. Generalmente, la mayoría de estos datos adquiridos a bordo son los llamados datos brutos que

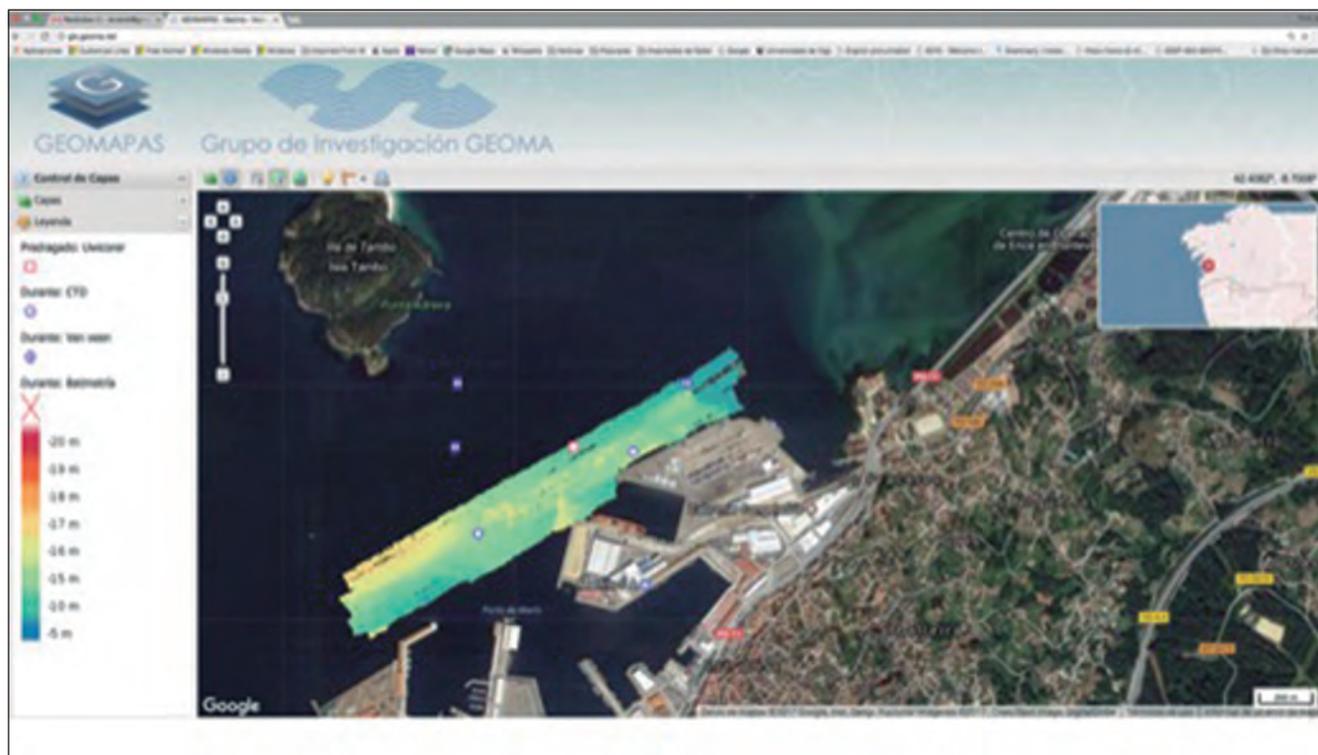


FIGURA 5. Pantallazo del gestor WebGIS en geomapas (<http://gis.geoma.net>), en el que se muestran en varias capas del gestor: una batimetría en un sector del puerto de Marín realizada durante un dragado, las posiciones de los CTDs (círculos), muestreo con testificador-Uwicorer (cuadrado) y muestreos con draga Van Veen (círculos con línea central).

requieren de procesados posteriores de diversa índole, hasta obtener el producto final (mapa, mosaico) deseado. Por ejemplo, los datos morfológicos obtenidos con el SBL requieren de la realización de mosaicos, que combinan la información obtenida en las distintas líneas. Este procesado puede realizarse con paquetes de procesado del tipo Sonar-Pro o el Delph Sonar. Algo similar ocurre con los datos batimétricos que deben ser procesados teniendo en cuenta los movimientos del barco, las mareas, el oleaje, etc. para obtener mapas batimétricos de alta resolución. Estos tipos de procesado pueden realizarse con diversos tipos de software como puede ser el Caris, para la obtención de datos batimétricos, u otros programas de acceso libre. De igual modo, los datos de corrientes, oleaje, y otros parámetros oceanográficos obtenidos con correntímetros, CTDs, etc. deben analizarse mediante diversos paquetes de modelado costero (REFDIF, H2D, H3D). Las muestras de aguas o sedimentos requieren, a su vez, de la realización de diversos análisis físico-químicos para una correcta interpretación del estado o calidad de los mismos, que generalmente se realizan posteriormente en el laboratorio.

Es importante considerar en este punto la conexión entre los distintos paquetes de procesado de datos (Caris, Kindom Suite, ISE), que permitan visualizar los datos espaciales de un gran rango de tipos de ficheros y exportarlos en modelos interactivos 3D, así como crear mapas base de alta calidad con datos geológicos tanto sísmicos como de sondeos. Los productos finales serían, por tanto, toda una serie de mapas de distintas características: batimétricos, de oleaje, de distribución y composición química de sedimentos, etc. Esta gran diversidad exige la necesidad de contemplar un mecanismo que pudiese integrar los datos de todos los sensores en un sistema de información geográfica (GIS). Para ello se requiere establecer unos formatos de intercambio y recuperación de datos, cuyo objetivo último es combinar la información obtenida de los distintos sensores y sus productos en un gestor webgis de la información. Se ha trabajado en los mecanismos y procesos de conversión para el desarrollo del web GIS GEOMApas. En la figura 5 se muestra un ejemplo de un pantallazo del gestor en el que se aprecia la combinación de datos de una batimetría junto con los datos de toma de testigos y muestras superficiales, junto con las posiciones de

los datos de CTD. En la figura 6 se muestra una de las salidas en formato mapas de dicho gestor GIS. Se ha diseñado, por tanto, una interfaz web para visualizar datos geoespaciales a través de internet ofreciendo al usuario un acceso fácil e intuitivo a dichos datos y sin necesidad de conocimientos avanzados ni de instalar ningún tipo de software específico. La visualización de dichos datos está ya accesible en <http://gis.geoma.net>. Algunas de las secciones tienen clave de acceso, mientras que otras son visibles a todo el público. De tal manera que la interfaz es accesible desde cualquier ordenador con conexión a internet, creada con *javascript* y *php*.

En definitiva, INNDAGA permite su utilización en diversas actuaciones del litoral con el fin de monitorizar en todo momento la calidad de las aguas y sedimentos, permitiendo controlar y minimizar la afección al medio marino de dichas actuaciones. Esta herramienta puede ser de gran utilidad para diferentes organismos e instituciones con competencias en ambientes costeros, los protocolos de actuación diseñados pueden ser válidos para numerosas actuaciones en el litoral.

CONCLUSIONES

INNDAGA permite la adquisición en tiempo real de datos geoambientales para control y seguimiento de distintos tipos de actuaciones en entornos costeros (puertos, instalaciones singulares, espacios naturales protegidos, etc.), con un planteamiento de obtención combinada y simultánea de datos morfosedimentarios, oceanográficos y muestras de sedimento y aguas en zonas costeras, mediante un sistema integrado en una pequeña embarcación o plataforma de monitorización.

Entre las utilidades de INNDAGA cabe destacar su potencialidad para dotar a los gestores o autoridades competentes de una herramienta idónea para detectar y monitorizar la evolución de las zonas costeras, con una sensibilidad especial para las actividades turísticas. Con ella se puede mejorar la capacidad de respuesta ante determinadas contingencias o actuaciones en el litoral, mediante una detección y monitorización más rápida. Ello contribuye a introducir mejoras en la gestión integral en el marco de las recomendaciones de la Comunidad Europea.

REFERENCIAS

1. Blondel P. (2009). Handbook of Sidescan Sonar. Ed. Springer: 311 pp.
2. Crossland, C. J., Kermen, H. H., Lindeboom, H. J., Marshall Crosland J. I., Le Tissier M. D. A. (2005). Coastal fluxes in the Anthropocene. The land-ocean interactions in the coastal zone project of the International Geosphere-Biosphere Programme. Springer
3. DOCE 2002. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 6.6.2002. Recomendación del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de mayo de 2002 sobre la aplicación de la gestión integrada de las zonas costeras en Europa- 2002/413/CE.
4. World Tourist Organization (UNWTO) (2015). UNWTO Annual Report 2014. En: <http://www2.unwto.org/annualreport2014>. 88 pp
5. Lo Iacono, C. Gràcia, E., Diez, S., Bozzano, G., Dañobeitia, J., Alonso, B. (2008). Seafloor characterization and backscatter variability of the Almería Margin (Alboran Sea, SW Mediterranean) based on high-resolution acoustic data. *Marine Geology*, 250: 1-18.
6. Michaud F, Ratzov G, Sallarés V, Collot JY, Pazmiño N, de la Torre G. (2005). Métodos e Instrumentación acústica para la exploración en Geofísica Marina. 9-28.
7. Pearson S., Windupranata W., Pranowo S. W., Putri A., Ma Y., Vila-Concejo A., Fernández E., Méndez G., Banks J., Knights A. M., Firth L. B., Breen, B. B., Jarvis R, Aguirre J. D., Shengnan Chen, Smith, A. N.H., Steinberg P., Chatziniolaou E. and Arvanitidis C. (2016). Conflicts in some of the World harbours: what needs to happen next?. *Maritime Studies*, 15:10.
8. Richter C., Burbridge P.R., Bätje C., Knoppers B. A., Martins O., Ngoile M.A.K., O'Toole M. J. Ramachandran S., Salomons W., Talaue-Mcmanus L. (2001). Integrated Coastal Management in Developing Countries. En: Von Bodungen B., Turner, R.K. (eds). *Science and Integrated Coastal Management*. Dahlem University Press, Berlin, pp. 253-274.
9. Sardá, R. (2001). Shoreline Development on the Spanish Coast: problem identification and solutions. En: Von Bodungen B., Turner R.K. (eds). *Science and Integrated Coastal Management*. Dahlem University Press, Berlin, pp. 149-163.

MEDICINA PERIODONTAL: EL IMPACTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL EN LA SALUD GENERAL

Yago Leira^{1,2}, Juan Blanco¹

¹ Departamento de Periodoncia, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (España).

² Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela (España).

RESUMEN

Durante las últimas tres décadas, ha habido un gran interés sobre el impacto de la infección periodontal en la salud general. Tanto el paso de bacterias como de mediadores inflamatorios producidos en los tejidos periodontales puede predisponer al desarrollo de enfermedades vasculares con una base aterogénica o de complicaciones en el embarazo. Además, se ha sugerido un modelo patogénico en el que la enfermedad periodontal y la diabetes mellitus pueden tener una relación bidireccional en la que una de ellas aumenta el riesgo de padecer la otra y viceversa.

Por lo tanto, este artículo tiene como objetivo resumir: 1) la plausibilidad biológica mediante la cual la periodontitis contribuye al desarrollo de otras enfermedades sistémicas, 2) los datos de estudios epidemiológicos que apoyan esta asociación y, 3) la evidencia que hay sobre la influencia del tratamiento de la infección periodontal sobre estas patologías o variables subrogadas de las mismas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) es un proceso infeccioso multifactorial que se produce en los tejidos blandos y duros que soportan a los dientes. La prevalencia de EP aumenta significativamente con la edad, alcanzando el 65% en sujetos de 55 años o más (Carasol et al., 2016). Por ello, es de gran importancia desde el punto de vista de salud pública el potencial papel de esta enfermedad tratable como fuente de inflamación sistémica, la cual puede aumentar el riesgo de padecer alguna enfermedad en otras zonas del cuerpo (Papapanou, 2015).

A partir de 1989, cuando un grupo de investigadores finlandeses publicaron el primer artículo en el que se ponía de manifiesto que las personas que habían sufrido un infarto de miocardio tenían una peor salud dental que los individuos sin problemas cardiovasculares (Mattila et al., 1989), el concepto de *Medicina Periodontal* propuesto por Offenbacher en 1996 empezó a cobrar fuerza. La *Medicina Periodontal* establece la relación bidireccional entre la enfermedad periodontal y la salud general (Williams & Offenbacher, 2000).

Actualmente, ya son 57 condiciones sistémicas las que pueden estar relacionadas con la EP, lo cual sugiere la posibilidad de pensar en procesos fisiopatológicos comunes tales como la bacteriemia o la liberación de mediadores inflamatorios, ya sea desde los tejidos periodontales o mediante la inducción de una respuesta de fase aguda (Monsarrat et al., 2016). Con el objetivo de recopilar toda la evidencia científica disponible respecto a este tema, en Noviembre de 2012 la Federación Europea de Periodoncia junto con la Academia Americana de Periodoncia llevaron a cabo un workshop internacional conjunto. Fruto de esta reunión de expertos, se elaboraron una serie de revisiones y consensos que se publicaron en 2013 en los suplementos de las prestigiosas revistas *Journal of Clinical Periodontology* y *Journal of Periodontology*.

En el presente artículo se revisará la asociación de la EP con 1) aterogénesis y enfermedad vascular aterosclerótica (EVA), 2) diabetes mellitus (DM), y 3) parto prematuro, bajo peso al nacer y otras complicaciones del embarazo. Para ello, se hará un repaso de la principal evidencia disponible incluyendo estudios epidemiológicos, de intervención y mecanismos fisiopatológicos que podrían explicar estas relaciones.

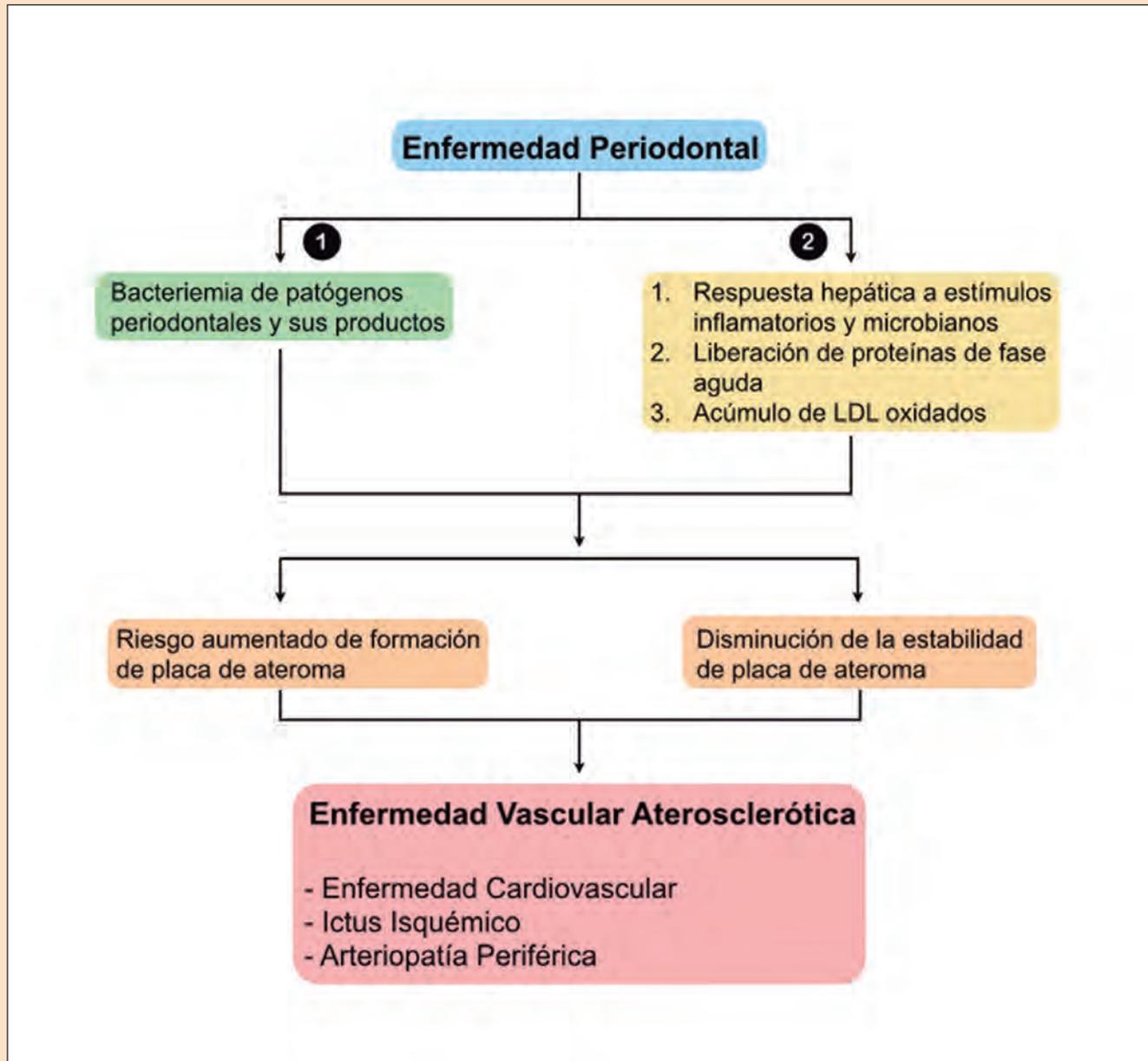


FIGURA 1. Posibles mecanismos fisiopatológicos que pueden relacionar la EP y la EVA. Nótese que 1 corresponde a la vía directa o infecciosa y 2 a la vía indirecta o inflamatoria.

ENFERMEDAD PERIODONTAL Y ENFERMEDAD VASCULAR ATEROSCLERÓTICA

Plausibilidad biológica

A partir del momento en que la aterosclerosis se consideró como un proceso inmunoinflamatorio, diversos agentes infecciosos han sido estudiados para analizar su papel en el inicio de la aterogénesis. Cuando se produce la infección periodontal, el epitelio ulcerado de la bolsa periodontal tiene una gran superficie que está en contacto con las bacterias periodontales caracterizadas por un gran potencial de virulencia. Ciertos procedimientos dentales rutinarios como el cepillado dental o el sondaje de bolsas periodontales pueden inducir el paso de estas bacterias al torrente sanguíneo (i.e., bacteriemia). Por consiguiente, la probabilidad de que ocurran bacteriemias recurrentes en pacientes con EP es alta y podría facilitar la diseminación de periodontopatógenos y sus productos (i.e., lipopolisacáridos) a sitios distantes así como explicar la detección de estas bacterias en placas de ateroma (Reyes et al., 2013).

Paralelamente, los mediadores inflamatorios (i.e., citoquinas proinflamatorias y reactivantes de fase aguda) que se producen localmente en los tejidos periodontales pueden diseminarse sistémicamente. Estos estímulos inflamatorios producen una respuesta a nivel hepático que hace que se libere proteína C reactiva (PCR) (Schenkein & Loss, 2013). De hecho, un metaanálisis mostró que los niveles plasmáticos de PCR en pacientes periodontales estaban significativamente más elevados que en pacientes periodontalmente sanos (diferencia de medias ponderadas = 1,56 mg/L) (Paraskevas et al., 2008). Esta diferencia puede interpretarse como de gran relevancia clínica, ya que el padecer EP puede hacer que una persona entre en la categoría de alto riesgo vascular (PCR >3 mg/L).

En conclusión, existen dos posibles vías mediante las cuales la EP puede contribuir a las EVAs (i.e., enfermedad cardiovascular, enfermedad cerebrovascular y arteriopatía periférica obliterante): 1) Infecciosa, en la que las bacterias periodontales producen un efecto directo en la formación de la placa de ateroma; 2) Inflamatoria, en la que es la respuesta mediada por el huésped la que va a promover la formación de la placa arterial (Figura 1).

Relación epidemiológica

Muchos estudios publicados en los últimos 25 años han investigado la asociación entre la EP y la enfermedad coronaria, infarto de miocardio, ictus y arteriopatía periférica. Recientemente, un metaanálisis ha demostrado que la EP

aumenta de manera significativa el riesgo de ictus isquémico (RR=2,88; IC 95%: 1,53-5,41) (Leira et al., 2016). Del mismo modo, otro metaanálisis ha encontrado una asociación moderada y positiva entre la EP y la presencia de enfermedad cardiovascular (OR = 2,35; IC 95%: 1,87-2,96) (Blaziot et al., 2009). En cuanto a la relación entre la EP y la arteriopatía periférica, aunque la evidencia es limitada, también se ha observado que la infección periodontal puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de arteriopatía vascular periférica (OR = 2,17; IC 95%: 1,2-3,8) (Mendez et al., 1998).

Cabe destacar que estas asociaciones positivas entre EP y los distintos tipos de EVAs se mantienen tras el ajuste de factores de riesgo vasculares conocidos como edad, sexo, raza, consumo de tabaco, DM, hipertensión, raza, nivel socioeconómico o índice de masa corporal.

Efecto del tratamiento periodontal en biomarcadores vasculares

Conclusiones de un metaanálisis publicado recientemente ponen de manifiesto el efecto positivo del tratamiento de la infección periodontal sobre el riesgo de EVA a través de la reducción de los niveles de marcadores inflamatorios (i.e., interleuquinas, PCR y factor de necrosis tumoral alfa), fibrinógeno y de función endotelial, el cual se mantiene hasta 6 meses tras el tratamiento periodontal no quirúrgico (Teeuw et al., 2014).

Dado que estos biomarcadores han sido asociados con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, la terapia periodontal puede proporcionar un efecto beneficioso en la reducción del riesgo de un evento vascular (D'Aiuto et al., 2013). Sin embargo, se necesitan realizar estudios de intervención para evaluar el efecto directo del tratamiento periodontal en eventos vasculares incidentes para así confirmar una relación causa-efecto entre la EP y la EVA.

ENFERMEDAD PERIODONTAL Y DIABETES

Plausibilidad biológica

La DM es un factor de riesgo reconocido de EP avanzada. Sin embargo, en los años 90, diversas publicaciones han sugerido que los pacientes periodontales podían estar sometidos a un riesgo aumentado de padecer DM. En 1998, Grossi y Genco presentaban un modelo relación bidireccional entre la EP y la DM. Estos autores propusieron que la síntesis y secreción de citoquinas producidas por el estímulo crónico derivado de los lipopolisacáridos y otros productos de las bacterias

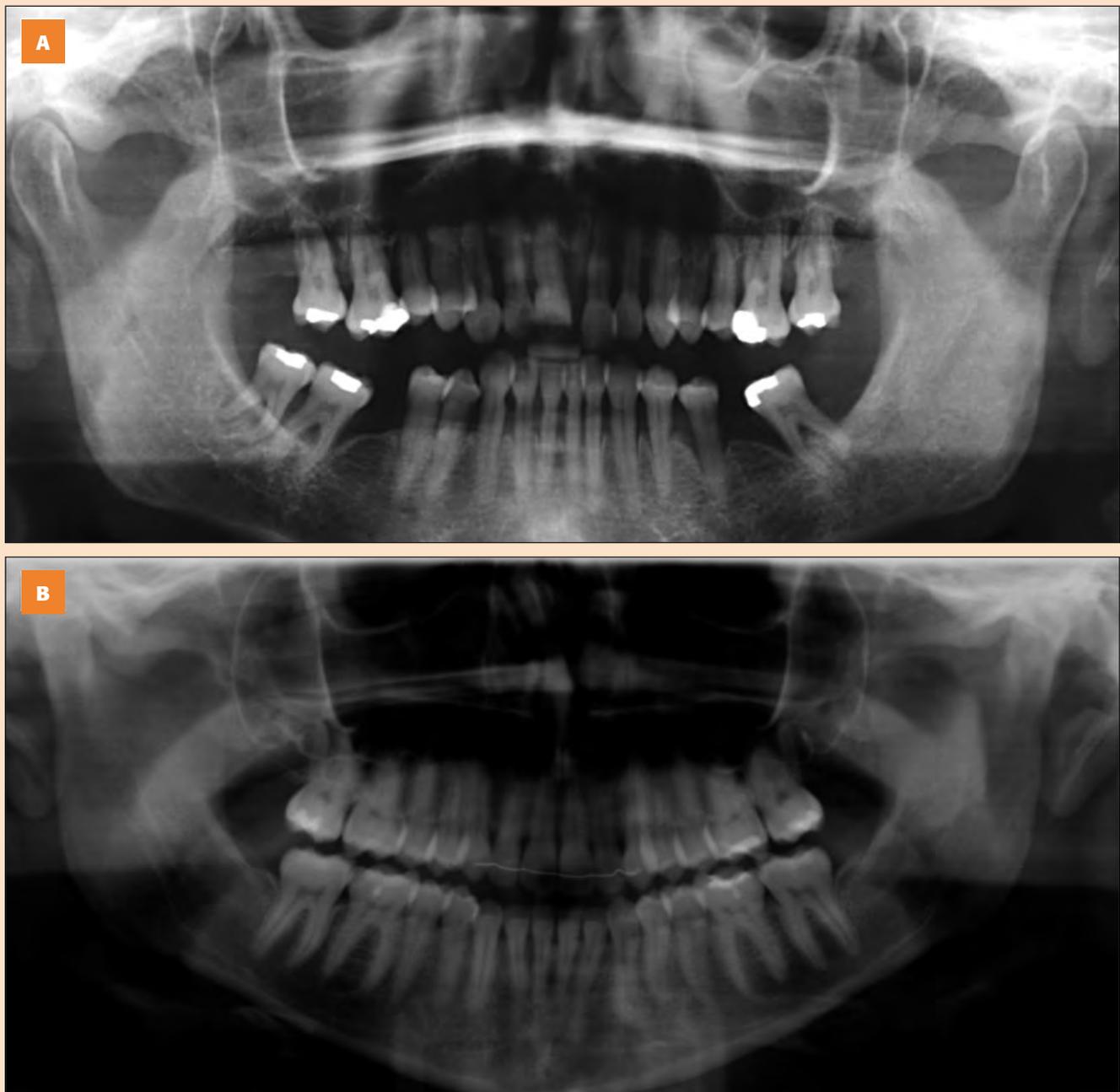


FIGURA 2. A: Paciente con EP generalizada avanzada y DM tipo 2. Se puede observar una pérdida ósea alveolar avanzada afectando a la mayoría de dientes. **B:** Persona sin EP ni DM. Los niveles del hueso alveolar son normales, donde la cresta ósea está cercana al nivel de la línea amelocementaria (límite entre la corona y la raíz del diente).

periodontales podrían aumentar la magnitud de la respuesta de los productos finales de la glicosilación avanzada en la DM. La combinación de estos dos procesos, puede sostener la hipótesis de un aumento de la destrucción tisular observada en los pacientes diabéticos y de cómo la EP puede complicar la gravedad de la DM y el grado de control metabólico (Figura 2a y 2b).

Unos años más tarde, el mismo grupo de investigadores introdujo en esta relación otro factor clave, la obesidad. En este nuevo modelo fisiopatológico, la obesidad parece ser la responsable de un estado hiperinflamatorio que aumenta el riesgo de padecer EP, y la resistencia a la insulina parece mediar dicha asociación (Genco et al., 2005).

Relación epidemiológica

El riesgo de que una persona con DM padezca EP casi se triplica en comparación con gente sin DM (Chavarrí et al.,

2009). A raíz de los estudios llevados a cabo en los años 90 en una población de indios Pima, se demostró que aquellos individuos con DM tipo 2 mostraban una prevalencia e incidencia de EP significativamente mayor que en aquellos que no eran diabéticos (Nelson et al., 1990). Del mismo modo, la DM tipo 1 también aumenta el riesgo de EP (figura 3). En el 2007, un estudio realizado en 700 niños de edades comprendidas entre 6 y 18 años (350 diagnosticados de DM y 350 niños no diabéticos) mostró que la pérdida de inserción periodontal fue significativamente mayor en niños diabéticos en comparación con los controles (Lalla et al., 2007).

Por otro lado, formas avanzadas de EP se han asociado con un riesgo aumentado de un mal control glucémico (Taylor et al., 1996) y de complicaciones diabéticas tales como la nefropatía o la proteinuria (Karjalainen et al., 1994). Además, se ha demostrado una relación dosis-respuesta entre un marcador de inflamación periodontal (i.e., área de la superficie



FIGURA 3. Paciente con EP avanzada y DM tipo 1 mal controlada. Nótese la inflamación gingival generalizada, acúmulo de placa dental y recesión gingival en la mayoría de los dientes, lo que da lugar a una pérdida de inserción periodontal clínicamente notable.

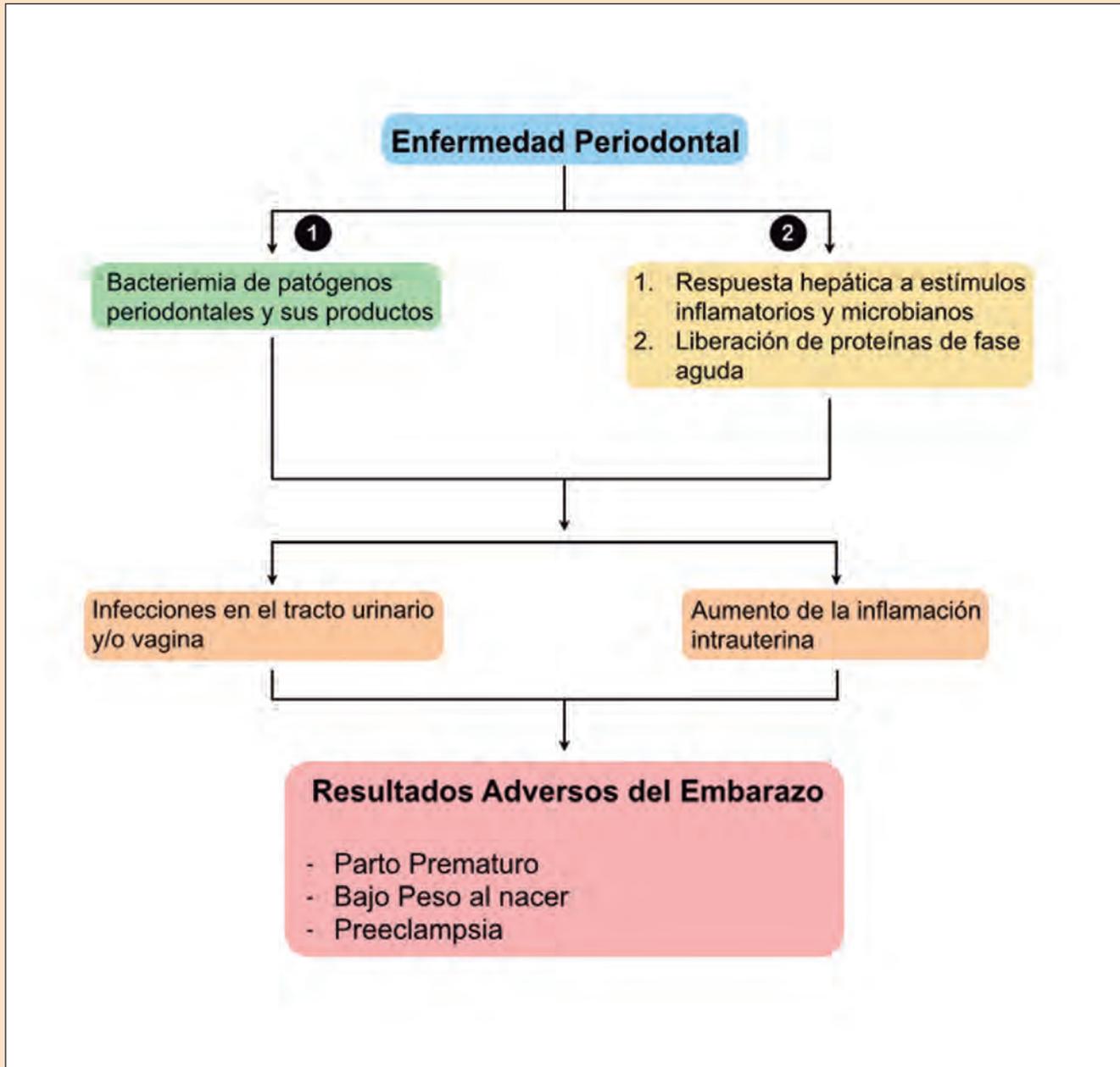


FIGURA 4. Posibles mecanismos fisiopatológicos que pueden relacionar la EP y los resultados adversos del embarazo. Nótese que 1 corresponde a la vía directa o infecciosa y 2 a la vía indirecta o inflamatoria.

periodontal inflamada) y la hemoglobina glucosilada (HbA1c) en pacientes con DM tipo 2, lo que puede sugerir una asociación causal entre ambas patologías (Nesse et al., 2009).

Efecto del tratamiento periodontal en el control metabólico

En 2013, un metaanálisis en el que se incluyeron 9 estudios de intervención con un total de 719 pacientes diagnosticados de DM tipo 2 (398 sujetos en los grupos de tratados y 321 en los grupos control no tratados), se observó que tras la terapia periodontal no quirúrgica se producía una reducción media ponderada de los niveles de HbA1c del 0,36 % (Engelbreton & Kocher, 2013).

Recientemente, otro metaanálisis basado en 4 ensayos clínicos controlados y aleatorizados mostró que el tratamiento de la infección periodontal se tradujo en una reducción significativa en los niveles de glucemia en ayunas en pacientes diabéticos tipo 2 (reducción de medias ponderadas = 8,95 mg/dl) (Teshome & Yitayeh, 2017).

ENFERMEDAD PERIODONTAL Y RESULTADOS ADVERSOS DEL EMBARAZO

Plausibilidad biológica

La EP es una enfermedad infecciosa que ocurre lejos de la unidad feto-placentaria. Las bacterias periodontales y sus productos pueden diseminarse al torrente sanguíneo llegando a alcanzar las membranas de la placenta. Estos periodontopatógenos pueden: a) provocar infecciones en el tracto urinario o en la vagina, las cuales se consideran factores de riesgo de parto prematuro y bajo peso al nacer y/o; b) inducir una respuesta inflamatoria local que provoque un aumento de mediadores inflamatorios que contribuyan a complicaciones del embarazo (i.e., parto prematuro, bajo peso al nacer y preeclampsia) (Bobetsis et al., 2013).

Por otro lado, existe una vía indirecta por la cual la EP podría predisponer a problemas en el embarazo. Las citoquinas y mediadores inflamatorios producidos en los tejidos gingivales como respuesta al ataque bacteriano pueden entrar en la sangre y alcanzar la unidad feto-placentaria promoviendo el acúmulo de grandes cantidades de estos mediadores inflamatorios. Además, también se puede producir una respuesta hepática que dará lugar a la producción de reactantes de fase aguda. Todos estos mediadores y citoquinas serán los responsables de un aumento inflamatorio a nivel intrauterino, lo que se traduce en una ruptura de las membranas del saco amniótico,

contracción del útero y dilatación cervical, dando como resultado un parto prematuro (Madianos et al., 2013).

En conclusión, existen dos posibles vías mediante las cuales la EP puede contribuir a complicaciones del embarazo: 1) Infecciosa, en la que las bacterias periodontales y sus productos producen un efecto directo en la producción de resultados adversos del embarazo; 2) Inflamatoria, en la que es la respuesta mediada por el huésped la que va a promover un aumento de la inflamación dentro del útero provocando problemas durante el embarazo (Figura 4).

Relación epidemiológica

Ide y Papapanou publicaron una revisión sistemática en 2013 en la que, tras revisar todos los estudios epidemiológicos disponibles, concluyeron que existe una asociación moderada entre una mala salud periodontal materna y complicaciones del embarazo. Además, esta relación parece ser independiente de otros factores de riesgo que pueden predisponer a estos resultados adversos del embarazo como son un nivel socioeconómico bajo, tabaquismo, raza/etnia o incluso la edad de madre. Sin embargo, los propios autores de esta revisión destacan que hay que ser cautos a la hora de interpretar los resultados de estos estudios ya que existe una alta heterogeneidad de los datos en cuanto a la manera de definir la EP (variable continua vs. categórica), momento de examen de la mujer (antes o después del parto) o las poblaciones de estudio.

Efecto del tratamiento periodontal en los resultados adversos del embarazo

Los metaanálisis de ensayos clínicos controlados y aleatorizados en los que se incluían a mujeres embarazadas con periodontitis no encontraron una reducción significativa en el número de partos prematuros en aquellas que recibieron tratamiento periodontal no quirúrgico. Estos resultados negativos pueden ser debido a varios factores: a) la ausencia de una relación causa-efecto entre la EP y el parto prematuro o bajo peso al nacer; b) la existencia de factores de riesgo que pueden confundir el efecto del tratamiento periodontal; c) criterios periodontales incorrectos y; d) tratamiento periodontal insuficiente para afectar a los resultados del embarazo (Michalowicz et al., 2013).

Por lo tanto, el tratamiento periodontal materno durante el embarazo no disminuye el riesgo de parto prematuro/bajo peso al nacer (Chambrone et al., 2011).

CONCLUSIONES

En base a la evidencia científica disponible sobre la relación entre la EP y ciertas enfermedades sistémicas, parece razonable pensar que la boca se ha convertido en una parte integral del resto del cuerpo humano. ¿Es un prerrequisito para la salud general tener las encías sanas? Aunque hace años esta pregunta tenía como respuesta “No lo sabemos”, actualmente ésta se ha convertido en un “Posiblemente sí”.

Médicos y periodoncistas están trabajando conjuntamente para promover la salud periodontal como una parte integral dentro del manejo global de pacientes con este tipo de patologías, las cuales se ha demostrado que están relacionadas con la infección periodontal.

AGRADECIMIENTOS

Esta revisión ha sido parcialmente financiada con fondos del Instituto de Salud Carlos III (PI13/02027; PI/01578). Yago Leira es beneficiario de una beca predoctoral otorgada por el Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blaizot A, Vergnes J-N, Nuwwareh S, Amar J, Sixou M. (2009). Periodontal diseases and cardiovascular events: meta-analysis of observational studies. *International Dental Journal* 59,197-209.
2. Bobetsis YA, Borgnakke WS, Papapanou PN. (2013). Periodontal infections and adverse pregnancy outcomes. In: Glick M, editor, *The Oral-Systemic Connection: Quintessence*. Chicago: Quintessence; 201-219.
3. Carasol M, Llodra JC, Fernández-Meseguer A, Bravo M, García-Margallo MT, Calvo-Bonacho E, Sanz M, Herrera D. Periodontal conditions among employed in Spain. (2016). Periodontal conditions among employed adults in Spain. *Journal of Clinical Periodontology* 43,548-556.
4. Chambrone L, Pannuti CM, Guglielmetti MR, Chambrone LA. (2011). Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight. II. A systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. *Journal of Clinical Periodontology* 38,902-914.
5. Chavarri NGM, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A. (2009). The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: A meta-analysis. *Oral Health & Preventive Dentistry* 7,107-127.
6. D'Aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC. (2013). Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *Journal of Clinical Periodontology* 40(Suppl. 14),S85-S105.
7. Engebretson S, Kocher T. (2013). Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 40(Suppl. 14),S153-S163.
8. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. (2005). A proposed model linking inflammation, obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of Periodontology* 76,2075-2084.
9. Grossi SG, Genco RJ. (1998). Periodontal disease and diabetes mellitus: A two-way relationship. *Annals of Periodontology* 3,51-61.
10. Ide M, Papapanou PN. (2013). Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcome –systematic review. *Journal of Clinical Periodontology* 40(Suppl. 14),S181-S194.
11. Karjalainen KM, Knuutila ML, von Dickhoff KJ. (1994). Association of severity of periodontal disease with organ complications in type 1 diabetic patients. *Journal of Periodontology* 65,1067-1072.
12. Lalla E, Cheng B, Lal S, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, Golland RS, Lamster IB. (2007). Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children. *Journal of Clinical Periodontology* 34,294-298.
13. Leira Y, Seoane J, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Takkouche B, Blanco J, Castillo J. (2016). Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Epidemiology* [Epub ahead of print].
14. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. (2013). Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *Journal of Clinical Periodontology* 40(Suppl. 14),S170-S180.
15. Mattila KJ, Niemen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ. (1989). Association between dental health and acute myocardial infarction. *British Medical Journal* 298,779-781.
16. Mendez MV, Scott T, LaMorte W, Vakonas P, Menzoian JO, Garcia R (1998). Association between periodontal disease and peripheral vascular disease. *The American Journal of Surgery* 176,153-157.
17. Michalowicz BS, Gustafsson A, Thumbigere-Math V, Buhlin K. (2013). The effects of periodontal treatment on pregnancy outcomes. *Journal of Clinical Periodontology* 40(Suppl. 14),S195-S208.
18. Monsarrat P, Blaizot A, Kémoun P, Ravaud P, Nabet C, Sixou M, Vergnes JN. (2016). Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. *Journal of Clinical Periodontology* 43,390-400.
19. Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, Pettitt DJ, Saad MF, Genco RJ, Knowler WC. (1990). Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care* 13,836-840.
20. Nesse W, Linde A, Abbas F, Spijkervet FKL, Dijkstra PU, de Brabander EC, Gerstenbluth I, Vissink A. (2009). Dose-response relationship between periodontal inflamed surface area and HbA1c in type 2 diabetics. *Journal of Clinical Periodontology* 36,295-300.
21. Offenbacher S. (1996). Periodontal diseases. Pathogenesis. *Annals of Periodontology* 1,821-878.
22. Papapanou PN. (2015). Systemic effects of periodontitis: lessons learned from research on atherosclerotic vascular disease and adverse pregnancy outcomes. *International Dental Journal* 65,283-291.
23. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 35,277-290.
24. Reyes L, Herrera D, Kozarov E, Roldán S, Progulské-Fox A. (2013). Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *Journal of Clinical Periodontology* 40(Suppl. 14),S30-S50.
25. Schenkein HA, Loos BG. (2013). Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 40(Suppl. 14),S51-S69.
26. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. (1996). Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Periodontology* 67,1085-1093.
27. Teeuw WJ, Slot DE, Susanto H, Gerdes VEA, Abbas F, D'Aiuto F, Kastelein JJP, Loos BG. (2014). Treatment of periodontitis improves the atherosclerosis profile: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 41,70-79.
28. Teshome A, Yitayeh A. (2017). The effect of periodontal therapy on glycemic control and fasting plasma glucose level in type 2 diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health* 17,31.
29. Williams RC, Offenbacher S. (2000). Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology. *Periodontology* 2000 23,9-12.

ESTRATEGIAS DE LA OSCURIDAD: ADAPTACIONES Y MODOS DE VIDA DEL MACROZOOPLANCTON EN MAR ABIERTO

Álvaro Roura Labiaga, Alexandra Castro-Bugallo

Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (IIM-CSIC), Pontevedra, España

INTRODUCCIÓN

La luz. La luz nos ilumina y posibilita la vida en nuestro planeta. La mayoría de ecosistemas terrestres dependen directamente de la energía lumínica para desarrollarse. Y, por ello, quizás cueste entender que exista vida sin luz. Pero si pensamos en el océano, ¿qué domina la mayor extensión de agua del planeta? La oscuridad. En el océano, a medida que la profundidad aumenta, la luz se reduce. En su viaje a través de la columna de agua, la luz se descompone en distintos colores que, en función de su longitud onda, alcanzan mayor o menor profundidad. Así, el color rojo (de mayor longitud de onda) es el que primero desaparece, mientras que el azul (de longitud de onda menor) es el que viaja hasta las zonas más profundas. En las aguas más transparentes de los océanos, la luz puede penetrar hasta 1.300 metros de profundidad (Johnsen 2001).

En este medio tan singular, sin ningún lugar donde poder esconderse y donde la luz solar va perdiendo un 10% de intensidad cada 75 metros de profundidad, pasar desapercibido es la regla y las adaptaciones varían mucho en función de la posición en la columna de agua. En los primeros 200 metros, la zona epipelágica, la luz filtrada permite la fotosíntesis y es la base de la cadena alimentaria que sustenta a los organismos de las profundidades. Aun así, allí donde los rayos del sol pierden su fuerza también existe vida, y mucha. Es la zona mesopelágica, entre los 200 y 1000 metros de profundidad, donde los organismos que la habitan disponen de adaptaciones únicas con un nexo común: la luz. En este ecosistema la luz que llega del sol es de un tenue color azul y los animales han adaptado sus modos de vida y morfología para explotar al máximo las características de este medio en continua penumbra. Las mayores concentraciones de animales bioluminiscentes del mundo se dan en esta zona,

donde la producción de luz es una herramienta esencial para comunicarse, como mecanismo de caza o para camuflarse donde, *a priori*, parece imposible hacerlo (Young, 1983).

Existe una conexión muy íntima entre las capas epipelágica y mesopelágica, debida a la mayor migración de organismos del planeta que se da con la puesta y la salida del sol. Esta migración de organismos fue detectada ya en la II Guerra Mundial por los sónares de submarinos y barcos que registraban ecos de un falso “fondo” entre 200 y 800 metros de profundidad, en zonas de océano abierto donde había miles de metros de profundidad. Estos ecos venían, no del fondo, sino de algo situado muy por encima de éste, que variaban de profundidad entre el día y la noche y que denominaron “Deep Scattering Layers” (DSL) o capas de dispersión profunda. Durante el día, se veían entre dos y tres capas entre los 200 y 800 m de profundidad, que al atardecer ascendían convergiendo en una única gran capa superficial de varios cientos de metros. Al amanecer las distintas capas se separaban y descendían a sus respectivas profundidades. Estas capas, aunque primero se pensó que eran discontinuidades físico-químicas de las masas de agua, posteriormente se comprobó que eran producidas por la migración vertical de millones de organismos (conocidos como “Diel Vertical Migrators”, DVM) que ascienden para alimentarse cerca de la superficie durante la noche (Heywood, 1996)

Este trabajo resume las principales comunidades de macrozooplancton (organismos de más de 2 cm) presentes en la zona oceánica del Atlántico Noreste. Se realizó en el marco del proyecto multidisciplinario “Canarias-Intercambio Ecosistema Marino Ibérico (CAIBEX)”, del 7 de julio al 5 de septiembre de 2009 (Roura, 2013). Este proyecto, consistió en

FIGURA 1. Representación vertical del macrozoopláncton antes de comenzar la migración hacia la superficie al ponerse el sol.



COMPOSICIÓN REALIZADA POR #ZOOPLANKTONING.

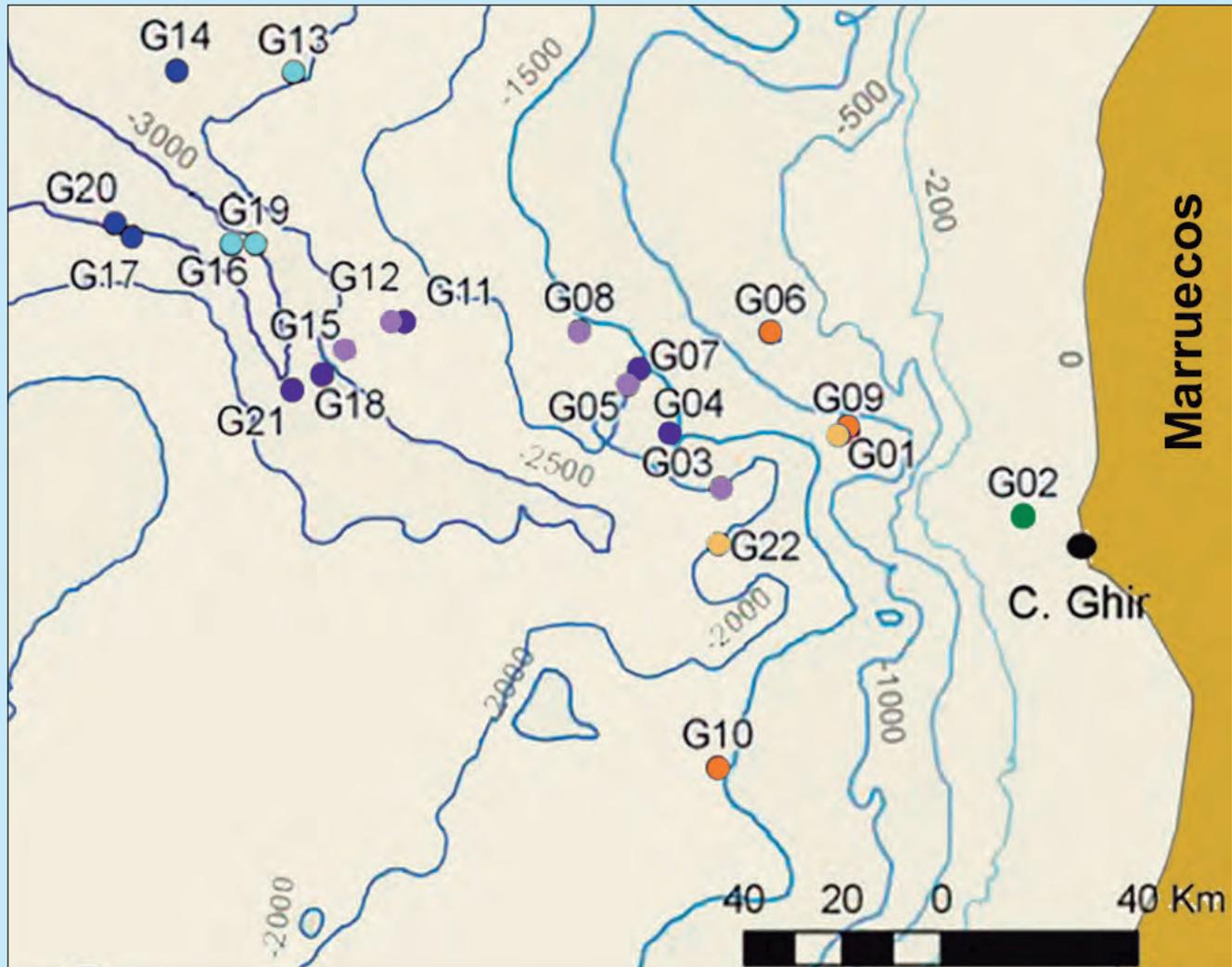


FIGURA 2. Mapa de la zona donde se recogieron las muestras de zooplancton durante la campaña CAIBEX-III, al oeste de Cabo Ghir (Marruecos, 31°N) tanto de día (colores claros) como de noche (colores oscuros) cerca de la costa sobre la plataforma (verde), en la zona influenciada por el afloramiento (naranja), en la trayectoria de la boya Lagrangiana (violeta) y en océano abierto (azul).

tres grandes campañas que pretendían definir la estructura tridimensional de los filamentos de agua costera fría aflorada y su repercusión a nivel físico, químico y biológico sobre el océano adyacente. En concreto, los datos recogidos para este trabajo proceden de una de las tres campañas realizadas en CAIBEX, en la zona de afloramiento permanente de Cabo Ghir, al oeste de Marruecos (31°N, CAIBEX-III). De los más de 60 muestreos de zooplancton realizado en esta campaña, todo el macrozooplancton se separó, se identificó y se estudió su distribución vertical durante el día y la noche. El objetivo de este trabajo es dar a conocer cómo la luz influye en la distribución vertical del macrozooplancton y mostrar algunas de las adaptaciones que han desarrollado para vivir en un medio tan atípico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Experimento Lagrangiano

Para la recolección de zooplancton se realizó un experimento Lagrangiano a bordo del buque oceanográfico "Sarmiento de Gamboa". Dicho experimento Lagrangiano se realizó colocando una boya de deriva en un filamento de agua costera aflorada, previamente localizada mediante imágenes por satélite. Una vez localizada la masa de agua aflorada, se largó la boya oceanográfica con un cabo de 100 metros de profundidad lastrado por un plomo de 100 Kg. A lo largo de su longitud dos grandes velas posibilitan que esta boya se desplace siguiendo el filamento de agua aflorada, en lugar de hacerlo por la influencia de los vientos superficiales. La descripción física del filamento de agua fría y su evolución espacio-temporal se puede encontrar en el trabajo de Sangrá et al. (2015).

2. Muestreo de zooplancton

El muestreo de zooplancton se realizó durante el día y la noche con una red bongo de 750 mm de diámetro y 375 µm de malla, equipada con un flujómetro mecánico. En las muestras recogidas más allá del talud continental (> 200 m profundidad) se hicieron arrastres doble oblicuos en tres estratos distintos 5, 100 y 500 m; mientras que sólo dos estratos, 5 y 100 m, se muestrearon sobre la plataforma continental (< 200 m profundidad). Conforme la boya de deriva era transportada por el filamento de agua aflorada mar adentro, se llevaron a cabo muestreos de zooplancton en su proximidad (Fig. 1, color violeta), tanto de día (colores claros) como de noche (colores oscuros). A mayores, se realizaron muestreos en océano abierto (Fig. 1, color azul), en la zona de afloramiento adyacente al filamento (Fig. 1, color naranja)

y en la zona de agua aflorada cerca de la costa (Fig. 1, color verde). Las muestras fueron fijadas en etanol al 70% y se procesaron en su totalidad para separar el macrozooplancton (> 2 cm). Los individuos se identificaron hasta el mayor nivel taxonómico posible y se fotografiaron con una cámara digital (Nikon DXM1200F) bajo un binocular (Nikon SMZ800).

RESULTADOS

Las larvas de los estomatópodos o gambas mantis (2,7%) fueron el único macrozooplancton observado en el dominio costero. El 97,3% restante se encontró más allá del talud continental. Los grupos más comunes encontrados en estas muestras fueron los quetognatos (48%), los peces mesopelágicos (36,8%), los decápodos (9,5%), las larvas de estomatópodos (2,7%), los eufausiáceos krill (1,2%) y los anfípodos hipéridos (1,1%).

Dentro de los peces mesopelágicos, los gonostomátidos fueron los más comunes (29,4%, principalmente del género *Cyclothone* y algunos *Gonostoma*), seguidos por los peces linternas (*Myctophidae*, 2,8%) y *Vinciguerria* (*Phosichthyidae*, 2,65%). Dentro de los decápodos, las larvas de escilláridos (3,54%) y las gambas *Sergestesarcticus* (1,25%), *Gennadasbrevirostris* (0,76%), *S. robustus* (0,64%) y *Acanthephyra purpurea* (0,53%) fueron las más abundantes. Entre los eufausiáceos, *Nematoscelismegalops* fue el más común (0,51%), seguido por *Euphausiakrohni* (0,28%) y *Thyssonopodamicrophtalma* (0,26%). Pocos misidáceos fueron encontrados, pero las especies *Gnatophausiazoea* y *Lophogasterspinosus*, destacaron porque nunca fueron citadas en el área de estudio.

La abundancia de macrozooplancton durante el día fue particularmente alta en las muestras de superficie recogidas en el océano debida a la presencia de filosomas (larvas de langosta y de cigarra de mar) y larvas de estomatópodos (Fig. 3). La abundancia durante el día aumentó con la profundidad, predominantemente en el filamento y en las muestras oceánicas, donde los peces de la DSL (como *Cyclothone* o *Vinciguerria*) dominan las muestras junto con quetognatos encontrados principalmente a 500 m. Por el contrario, en la zona de afloramiento, la abundancia fue tres veces menor y el decápodo *Sergestesarcticus* dominó la muestra de 500 m de profundidad (G1). Esta situación cambió dramáticamente en la muestra G22 recogida 14 días después, una vez pasado el efecto del filamento de agua aflorada, donde los sergéstidos estaban ausentes y la fauna encontrada a 500 m estaba dominada por *Cyclothone* y quetognatos (Fig. 3).

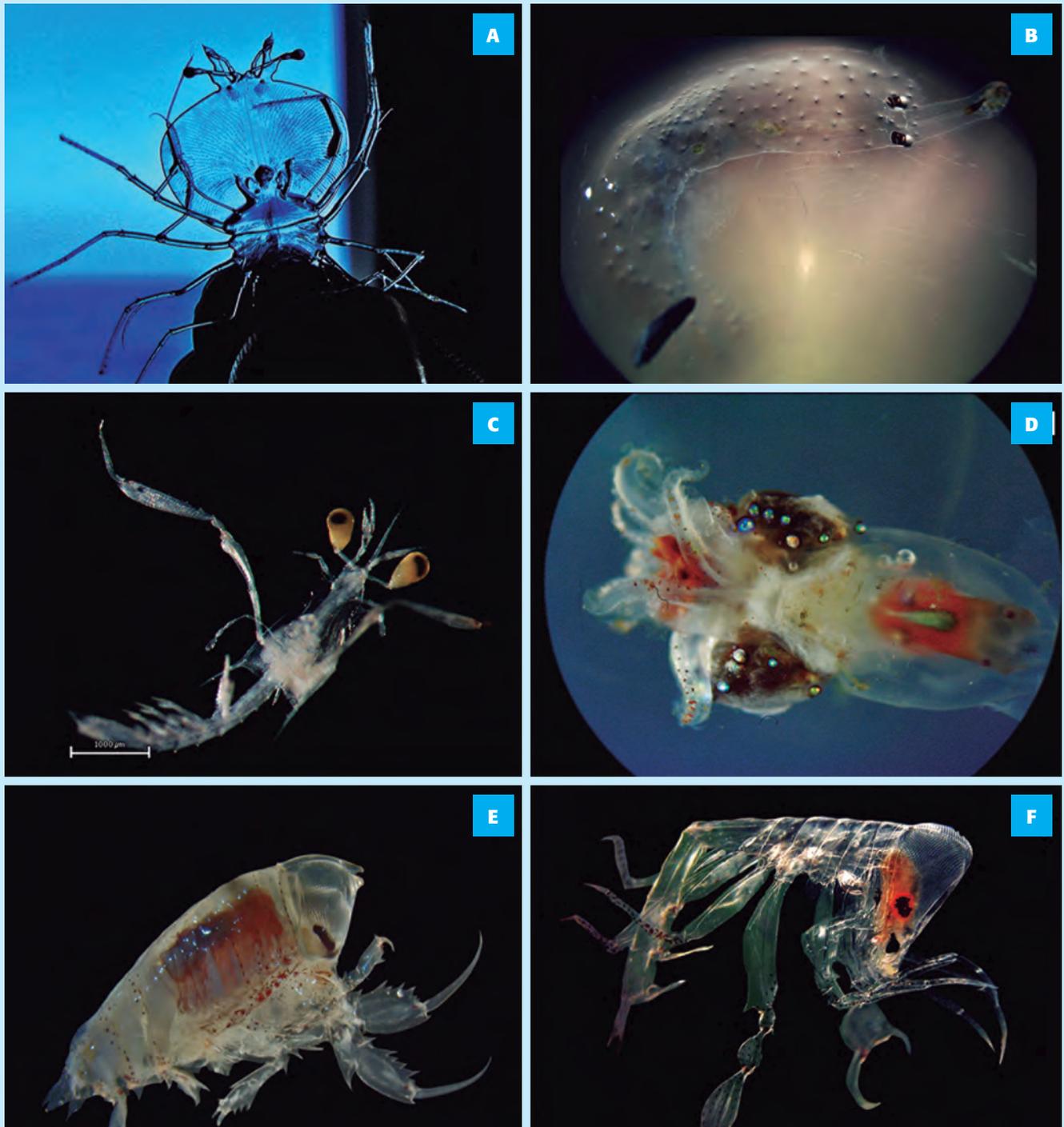


FIGURA 3. Organismos adaptados a vivir en la capa iluminada del océano con un denominador común, la transparencia: A) *Phyllosoma* de cigarra de mar *Scyllarus arctus*, B) *Pterotracheo Pterotracheacoronata*, C) larva de gamba mantis *Rissoidesdesmaresti*, D) calamar *Pyroteuthismargaritifera* y los anfípodos hipéridos E) *Phrosinasemilunata* y F) *Phronima sedentaria*.

FOTOGRAFÍAS DE #ZOOPLANKTONING.

Sin embargo, durante la noche, la abundancia de macrozooplancton aumentó notablemente en la superficie del filamento ya 500 m de profundidad en el filamento y en el océano, seguida por la zona de afloramiento (Fig. 3). Es particularmente notable la mayor abundancia de quetognatos encontrada en las muestras superficiales recogidas las dos últimas noches del experimento lagrangiano (G18, G21, Fig. 3). Estas extraordinarias abundancias pueden estar relacionadas con la presencia de un borde frontal entre las aguas frías ricas en nutrientes del filamento y las aguas oceánicas cálidas y oligotróficas. Muchos animales que fueron recogidos a 500 m durante el día fueron capturados por la noche a 100 m, como decápodos (*Systellaspisdebilis* y sergéstidos), eufausiáceos (*Euphausiakrohni*) y peces linterna. Además, se encontraron animales que realizan migración vertical desde capas más profundas a 500 m de profundidad durante la noche, como los decápodos (*Gennadasbrevirostris*, *Acanthephyra purpurea*, *Sergestesrobustus*) y misidáceos.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha observado como los distintos integrantes del macrozooplancton del Atlántico Noreste se distribuyen de manera distinta a lo largo de la columna de agua en función del día y de la noche. Esta zonación se debe al efecto de la luz que se filtra a lo largo de la columna de agua y que afecta a la distribución vertical de los distintos organismos (Roe, 1983). Mientras que en la zona superficial más iluminada las especies tienden a ser transparentes y de movimientos lentos para pasar desapercibidos, conforme se gana profundidad y la luz va desapareciendo, la coloración de los organismos va cambiando hacia colores más rojizos y finalmente hacia plateados-oscuros. Esta zonación, aparece representada esquemáticamente en la figura 2, se cumple principalmente durante las horas de sol. Conforme, la luz va desapareciendo, los organismos que se encuentran a distintas profundidades ascienden para escenificar una obra de teatro de sombras al abrigo de la oscuridad.

En los primeros metros de agua, la luz del sol descubre a casi cualquier organismo y no hay ningún sitio dónde esconderse. Ante esta dificultad, los organismos han desarrollado una singular adaptación: ser transparentes (Fig. 3). Con el fin de minimizar la posibilidad de ser detectados, varias especies de organismos han modificado las proteínas de su cuerpo para igualar la densidad óptica del agua de mar y conseguir ser transparentes. La única parte de su cuerpo que no es transparente son los ojos, ya que los pigmentos que recubren la retina impiden que ésta sea invisible (Johnsen, 2001). Este

es el caso de casi todo el macrozooplancton perteneciente a los grupos 1, 2 y 3, habitantes de la capa epipelágica que emplean la transparencia como modo de vida, incluyendo larvas de la cigarra de mar *Scyllarusarctus* (Fig. 3a), gambas del género *Pasiphaea*, pterotráqueos como *Pterotracheacoronata* (Fig. 3b), larvas de gambas mantis *Rissooidesdesmaresti*, (Fig. 3c), cefalópodos como *Pyroteuthismargaritifera* (Fig. 3d), organismos gelatinosos como medusas y ctenóforos o anfípodos hipéridos como *Phronima sedentaria* (Fig. 3e) y *Phrosinasemilunata* (Fig. 3f).

Otros organismos como decápodos, misidáceos, cefalópodos, cnidarios o eufausiáceos, han adquirido una coloración rojiza con el propósito de pasar desapercibidos a los ojos de los depredadores en la zona mesopelágica (Fig. 4). Así, en función de las necesidades de un organismo y la profundidad a la que vive, adquiere una coloración o evita otra. Siendo el color rojo el primer color que se pierde conforme se gana profundidad, es lógico que éste sea el favorito de aquellos organismos que prefieren no ser vistos en la zona mesopelágica, ya que no existe luz roja que los ilumine. En este caso muchos de los organismos pertenecientes a los grupos 4 y 5 tienen coloración rojiza, como el krill *Meganyctiphanesnorvegica* (Fig. 4a), cefalópodos como *Mastigoteuthishjoorti* (Fig. 4b) y gambas de profundidad como *Systellaspisdebilis* (Fig. 4c), *Sergestesrobustus* (Fig. 4d), *Gennadasbrevirostris* (Fig. 4e) o *Acanthephyra purpurea* (Fig. 4f).

Ciertos organismos marinos no sólo adquieren un patrón de colores determinado, sino que pueden producir su propia luz, proceso conocido como bioluminiscencia (Widder, 2001). Al igual que las luciérnagas en el medio terrestre, las cuales utilizan la luz para comunicarse entre sí, algunas criaturas oceánicas generan luz gracias a la reacción en presencia de oxígeno de la proteína luciferina y la enzima luciferasa. Otras especies albergan bacterias bioluminiscentes en simbiosis y son éstas las que producen la luz dentro de unos órganos de luz o fotóforos, que regulan mediante una lente y un músculo la salida de la luz. Casi todos los organismos pertenecientes a los grupos 4 y 5 producen bioluminiscencia en mayor o menor medida. La principal función de la bioluminiscencia a estas profundidades responde a tres tipos de adaptaciones: para comunicarse entre individuos de la misma especie, como método de defensa y como método de caza. A continuación se detallan los principales tipos de bioluminiscencia y su función.

Bioluminiscencia verde amarillenta

Encontrar a tu pareja en uno de los medios más extensos del planeta y tan oscuro debe de resultar difícil, por lo que muchos

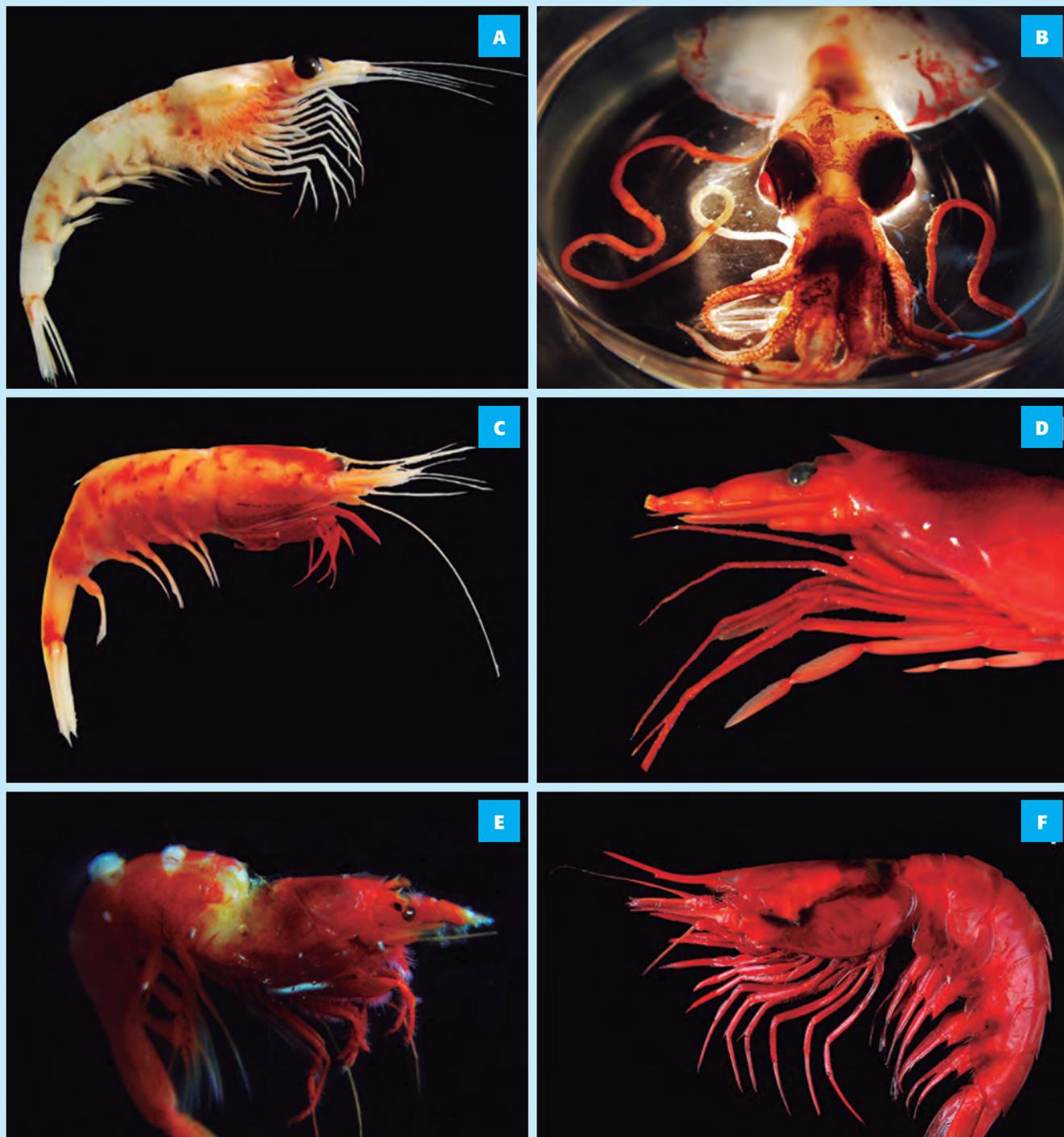


FIGURA 4. Habitantes de las profundidades que emplean la coloración roja para ser “invisibles” bajo luz azul: A) krill como *Meganyctiphanes norvegica*, B) cefalópodos como *Mastigoteuthis joorti* y gambas de profundidad como C) *Systellaspis debilis*, D) *Sergestes robustus*, E) *Gennadas brevisrostris* y F) *AcanthePHYRA purpurea*.

FOTOGRAFÍAS DE #ZOOPLANKTONING.

organismos recurren a la bioluminiscencia para comunicarse (Fig.5). Entre ellos destacan los peces pertenecientes a la familia de los Myctophidae, o peces linterna, que tienen fotóforos de color verde distribuidos en los laterales de su cuerpo, cuya disposición es característica de cada especie (Fig. 5a). El patrón de iluminación producido es muy diverso y su interpretación, un misterio de las profundidades, sólo descifráble por los peces linterna. Cabe destacar aquí al calamar *Pyroteuthismargaritifera*, cuyos fotóforos en los ojos se cree que son empleados para comunicarse con otros individuos y atraer a potenciales parejas (Fig. 3d).

Bioluminiscencia azulada

Este tipo es el más extendido en las profundidades. En un ecosistema iluminado por una lúgubre luz azulada, los depredadores clavan su mirada hacia la superficie en busca de presas que desvelen su silueta contra el azul reinante. De hecho, muchos organismos tienen ojos tubulares enfocados hacia arriba para captar hasta el último fotón de luz azul procedente de la superficie, como en la familia de los peces hacha (*Argyropelecus hemigymnus*, Fig.5b) o los anfípodos hipéridos (como *Phrosinasemilunata* o *Phronima sedentaria*, Figs. 3e, f). Otros tienen el ojo dividido en dos partes, con una enfocada hacia la superficie para captar la presencia de presas y otra para captar las señales de sus congéneres y depredadores, como ocurre en la especie de krill de profundidad *Nematoscelismegalops* (Fig. 5c). Casi todas las especies de krill cuentan con fotóforos azules entre los pleópodos del abdomen y en los laterales del cefalotórax, como en el caso de *Meganyctiphanes norvegica* (Fig, 5d).

En el caso de muchos peces que habitan en profundidad como los peces hacha, su aparato bucal también se proyecta hacia arriba para aspirar a presas situadas por encima de ellos. Estos peces tienen forma aplanada y su color es plateado para reflejar la mínima cantidad de luz procedente de la superficie. El color plateado de las escamas, como el de los peces linterna y los peces hacha (Figs. 5a, b) actúa como un espejo desviando los rayos de luz y es producido por cristales subcutáneos de guanina.

Además de contar con estas adaptaciones para evitar la luz o para detectarla de manera eficiente, los peces hacha, así como muchos otros organismos como eufausiáceos, cefalópodos, gambas y otros peces, poseen una hilera de fotóforos en posición ventral que producen luz azulada con la misma longitud de onda que la luz que desciende (Figs. 5a, b, e-h). Así, al encender los fotóforos cualquier depredador que les observe por debajo, verá como la silueta de su

presa se va difuminando contra el azul del entorno, hasta desaparecer completamente. Este mecanismo se conoce como contrailuminación y permite el camuflaje contra depredadores escondidos en la oscuridad más absoluta (Widder, 2001). Otro uso de la luz azul es la de actuar como método de alerta para prevenir posibles ataques de depredadores, o en último caso, una vez capturados, avisar a depredadores de mayor tamaño para que capturen al depredador. Este es el caso de la gamba de profundidad *Acanthephyra purpurea* (Fig. 4f). Esta gamba de intenso color rojo libera un chorro de tinta bioluminiscente azulada al ser atacada que ciega y “pinta” a su depredador en medio de la oscuridad, haciéndolo así visible para otro tipo de depredadores de mayor tamaño. La paradoja del cazador cazado. Análogamente, aunque no produciendo tinta bioluminiscente, las medusas de profundidad *Atolla wyvillei* y *Periphyllahyacinthina*, producen destellos bioluminiscentes azulados de fuerte intensidad para avisar al resto de un potencial peligro a modo de “gritos” de auxilio, que pueden atraer a depredadores de mayor tamaño.

Bioluminiscencia roja

Este tipo de bioluminiscencia se da principalmente en peces de profundidad como los peces víbora, los peces dragón, así como en algunas especies de peces linterna. La mayoría de los peces que tienen luz roja también cuentan con fotóforos de luz verde y azul, para comunicarse/atraer a presas y para camuflarse. Recordemos que la luz roja es aquella que desaparece en los primeros metros del océano y es el color que adoptan los organismos de profundidad con mayor frecuencia para pasar desapercibidos. Aprovechándose de esta adaptación, muchos peces de profundidad como el pez víbora (*Chauliodussloani*, Fig. 5e, f) emiten luz roja para “iluminar” a todos aquellos organismos de color rojo en medio de la oscuridad, invisibles a los ojos de otros cazadores. Y es que el pez víbora es un pez carnívoro, un depredador de las profundidades oceánicas. Los fotóforos rojos se localizan debajo de los ojos (Figura 5f, punto azulado), actuando como pequeños faros detectores de aquellas presas que entran en su radio de detección. Su intensidad no permite iluminar grandes distancias, por lo que para perfeccionar su técnica de caza utiliza una segunda luz mediante un fotóforo de luz verdosa situado en el extremo del primer radio de la aleta dorsal modificada (Fig. 5e), que se proyecta por delante de la cabeza y atrae a potenciales presas. Como el color verde es el más utilizado entre los organismos marinos de hábitats profundos para comunicarse entre sí, éste es el color que emplea el pez víbora para atraer a las presas justo encima de sus temibles fauces, las más grandes del reino animal.

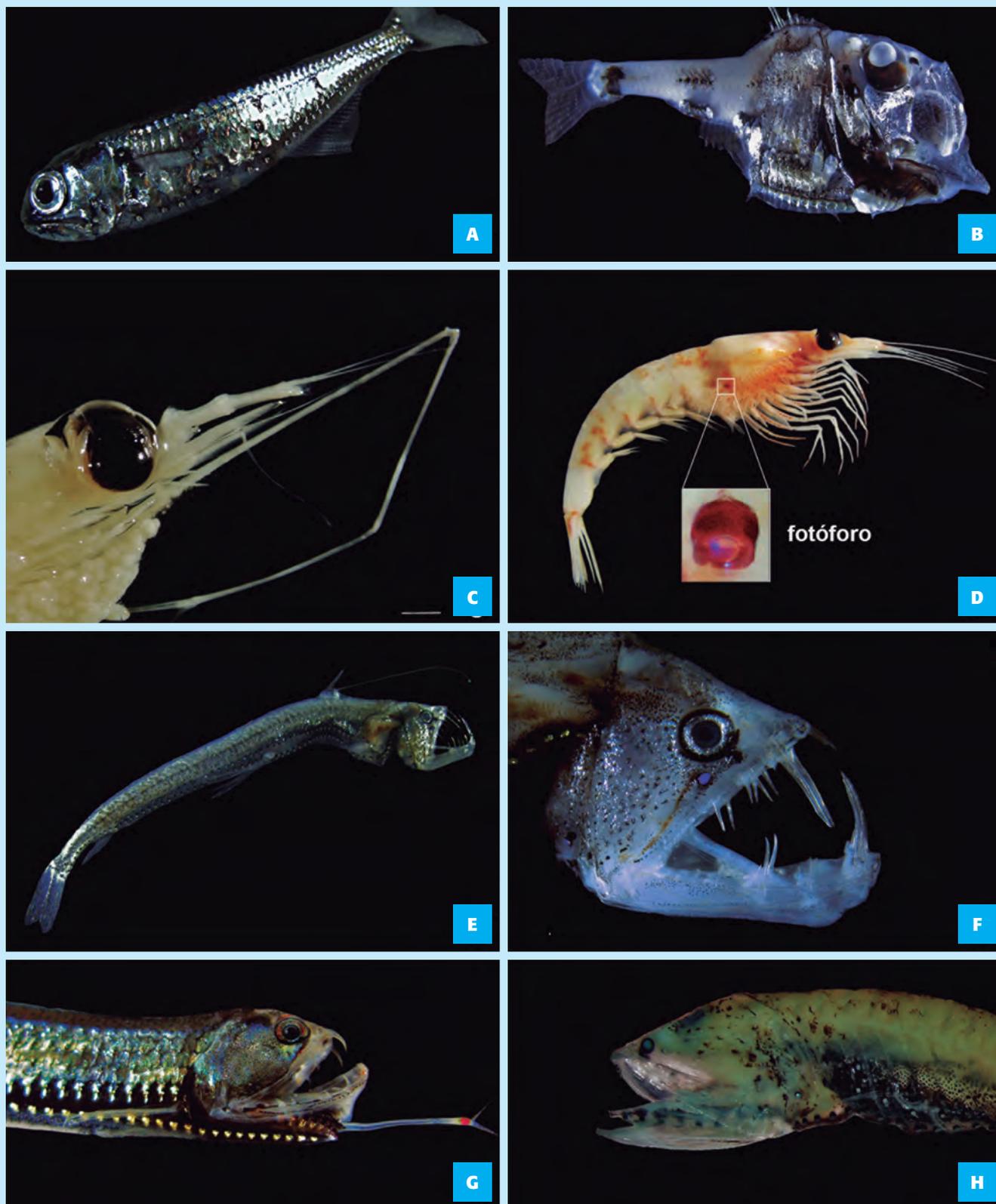


FIGURA 5. Macrozooplancton bioluminiscente: A) pez linterna o mictófidio, B) pez hacha *Argyropelecus hemigymnus*, C) krill *Nematoscelismegalops* y su ojo dividido, D) krill *Meganyctiphanes norvegica*, E, F) pez víbora *Chauliodussloani*, g) pez dragón *Stomias boa*, H) *Cyclothonesp.*, el organismo vertebrado más abundante del planeta.

FOTOGRAFÍAS DE #ZOOPLANKTONING.

Dicho fotóforo de luz roja también cumple una función muy importante en la búsqueda de pareja, ya que se sabe que el órgano luminoso de los machos es de mayor tamaño que el de las hembras. Muchos de estos peces disponen de una membrana que puede cubrir parcial o totalmente el fotóforo, de manera que pueden regular cuándo y cómo encenderlo, para enviar mensajes de luz en código morse a posibles parejas ocultas en la oscuridad.

Otra adaptación de los peces de profundidad es la presencia de pigmentos oscuros en las paredes del esófago y estómago, para evitar que la bioluminiscencia producida por las presas ingeridas los delate y sean atacados por otros depredadores. Otros, como el pez dragón (*Stomias boa*) puede emitir luz verde a partir de un señuelo situado en un órgano situado en la barbilla (Fig. 5g), con dos propósitos bien distintos: a) para atraer a los de su especie y b) como señuelo para atraer a sus presas. No podemos olvidar que estos peces de profundidad, así como *Cyclothone*, el vertebrado más abundante de la Tierra (Fig. 5h), también cuentan con hileras de fotóforos azules en su vientre para no ser detectados por depredadores acechando en la oscuridad.

Existen muchos organismos que viven en zonas del planeta donde la luz no ilumina, sino que es arma y defensa a la vez. Es en este reino de camuflaje y despiste, donde ocurren adaptaciones que superan a la ficción e incluso la inspiran, como en el caso de la criatura de "Alien". Éste es el caso del anfípodo hipérico *Phronima sedentaria* (Fig. 3f), un habitante de las profundidades que se alimenta del interior de las salpas y utiliza la túnica externa, aun viva, a modo de casa ambulante donde cuidar a sus crías una vez salen del marsupio (Boxshall, 2005). Esta especie, de grandes garras y cabeza deformada para albergar unos ojos modificados que maximizan la captación de luz procedente de la superficie, inspiró a la criatura de "Alien" en su versión cinematográfica. Conocemos la superficie de la luna o de cualquier planeta del sistema solar mejor que las profundidades de los océanos. Todavía quedan muchas especies por descubrir, muchas adaptaciones por entender y muchas mentes por inspirar en lo más profundo del océano.

REFERENCIAS

1. Boxshall, G. A. (2005) Crustacean parasites (Amphipoda, p. 165-169) in *Marine Parasitology*. Rohde K, Editor. CABI Publishing, Australia.
2. Heywood, K. J. (1996) Diel vertical migration of zooplankton in the Northeast Atlantic. *J. Plankton Res.* 18, 163-184.
3. Johnsen, S. (2001) Hidden in plain sight: the ecology and physiology of organismal transparency. *Biol. Bull.* 201, 301-318.
4. Roe, H. S. J. (1983) Vertical distributions of euphausiids and fish in relation to light intensity in the Northeastern Atlantic. *Mar. Biol.* 77, 287-298.
5. Roura, Á. (2013) Ecology of planktonic cephalopod paralarvae in coastal upwelling systems. Tesis doctoral, Universidad de Vigo, 219 pp.
6. Sangrà, P., Troupin, C., Barreiro-González, B., Barton, E. D., Orbi, A., and Arístegui, J. (2015) The Cape Ghir filament system in August 2009 (NW Africa). *J. Geophys. Res. C Ocean.* 120, 4516-4533.
7. Widder, E. A. (2001) Marine bioluminescence. *Biosci. Explain.* 1, 1-9.
8. Young, R. E. (1983) Oceanic bioluminescence: an overview of general functions. *Bull. Mar. Sci.* 33, 829-845.

NORMALIZACIÓN DE SEÑAL EN WESTERN BLOTTING CUANTITATIVO. USO DE LA PROTEÍNA TOTAL MEDIANTE LA TINCIÓN CON AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE

Óscar Mariño Crespo, Almudena Fernández Briera*, Emilio Gil Martín*

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología. Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO). Universidad de Vigo.

*Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo

RESUMEN

La cuantificación de los resultados obtenidos mediante *western blotting* (WB) es una de las principales herramientas de los estudios de biología molecular, específicamente en aquellos en los que se pretende comparar el nivel de expresión de una proteína en diferentes muestras biológicas. Tradicionalmente, esta aproximación se ha basado en el empleo de proteínas de expresión constitutiva como control de carga, cuyo nivel de expresión que mantiene es supuestamente constante durante la monitorización de la variable objeto de estudio. Sin embargo, numerosos estudios en años recientes han puesto de manifiesto que este postulado no se cumple siempre. En este artículo presentamos una alternativa sencilla, fiable y económica a la utilización de estas proteínas control: la normalización de la señal mediante la proteína total, medida como la intensidad de la tinción de la membrana con azul brillante de Coomassie.

INTRODUCCIÓN

El WB es una poderosa herramienta para el estudio de proteínas. Durante décadas ha permitido a bioquímicos y biólogos moleculares tanto la caracterización bioquímica básica de proteínas, como la valoración de sus niveles de expresión en muestras biológicas concretas o variación en determinadas condiciones.

Un protocolo estándar de WB consiste en tres técnicas moleculares de aplicación consecutiva:

1. **Electroforesis:** es la separación de proteínas a través de un gel de composición diversa y tamaño de poro regulable, de acuerdo a sus diferencias en una determinada propiedad físico-química, generalmente su masa molecular (M_r).
2. **Western blot:** es la transferencia de proteínas desde un gela una membrana sintética porosa compuesta de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Originalmente, el término *western blot* se refería exclusivamente a este proceso, aunque actualmente se utiliza indistintamente para denominar tanto la transferencia de las proteínas a una membrana como todo el proceso de *western blotting*.
3. **Inmunoblot:** es la detección de proteínas (u otros antígenos) transferidas a una membrana. Se lleva a cabo mediante anticuerpos que reconocen específicamente la proteína de interés, más un sistema de revelado que genera una señal cromogénica, luminiscente o fluorescente susceptible de ser captada por una cámara de alta sensibilidad.

El WB clásico o estándar (el descrito hasta el momento) permite detectar una proteína presente en una muestra biológica, pudiendo además estimar su M_r y precisar el número de variantes o subunidades que la constituyen. Sin embargo, para llevar a cabo WB cuantitativo, es decir, compararla expresión de una determinada proteína en una serie de muestras relacionadas, antes hay que despejar varias incertidumbres:

- a. Que la cantidad de proteína cargada sea la misma para todas las calles de un mismo gel. Si bien el operador tiene la capacidad de dispensar una cantidad específica de proteína, ésta es sólo teórica, pues está sujeta a imprecisiones técnicas y errores humanos durante la determinación de la concentración proteica de la muestra y también durante el proceso de carga.
- b. Que la transferencia de las proteínas a la membrana sea eficiente y homogénea. Aunque se ha tecnificado mucho desde su introducción, los preparativos del proceso de transferencia siguen siendo eminentemente manuales.
- c. Que la señal detectada se encuentre dentro del rango lineal de la relación cantidad de proteína-intensidad de señal. En caso contrario se incurriría en saturación de la imagen, lo cual implica que no se puede asegurar proporcionalidad entre la señal detectada y la cantidad de proteína.

De las tres incertidumbres señaladas anteriormente, las mejoras técnicas solamente han permitido solventar la tercera de ellas. A diferencia de los sistemas de revelado de *immunoblots* en película fotográfica, que tienen el inconveniente de que se desconoce el punto exacto de saturación de la imagen, los sistemas que utilizan las ultrasensibles cámaras CCD (*charge-coupled device*) junto con un *software* adecuado, permiten conocer en cada momento si se está trabajando en el rango lineal o, por el contrario, si la señal ha alcanzado el punto de saturación de la cámara. Las restantes incertidumbres, la de la carga proteica efectiva y la de la eficiencia de la transferencia, no han encontrado solución técnica a día de hoy.

Según lo dicho, la manera de lograr la cuantificación fiable de los resultados de WB es poder llevar a cabo la normalización de las señales detectadas en función de la carga proteica real depositada en cada calle del gel. Esta normalización se ha llevado a cabo principalmente mediante el uso de proteínas control de expresión constitutiva (*housekeeping proteins*), como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la β -actina o la α -tubulina. Estas proteínas son esenciales para la supervivencia de las células, independientemente del tipo celular o de su rol específico en el tejido u organismo, por lo que se asume que sus niveles de expresión no se ven alterados en función del tejido, estado de desarrollo, fase del ciclo celular o factores internos o externos a las células (Eisenberg y Levanon, 2013). En consecuencia, se acepta que la intensidad de la banda que generan las proteínas control

en los *immunoblots* proporcional a la cantidad de proteína cargada en cada calle, siendo la relación entre ambas variables lineal. Sin embargo, en los últimos años han aparecido evidencias en la literatura que ponen en cuestión el empleo de estas proteínas como control de carga universal. Así, el uso de proteínas control (que suelen presentar una expresión alta en las células) para normalizar los WB de proteínas de baja expresión puede conllevar que, con la carga proteica necesaria para visualizar la proteína de interés, la señal de la proteína control se haya saturado (Dittmer y Dittmer, 2006; Aldridge et al., 2008). Otro inconveniente es que, al contrario de lo que se creía, la expresión de las proteínas control sí que puede variar en condiciones fisiológicas normales (Alexander et al., 1985; Moskowitz y Oblinger, 1995) y patológicas (Liu y Xu, 2006; Álvarez-Chaver et al., 2007). De esta forma, el empleo de proteínas control debería venir acompañado siempre de la comprobación explícita de que su nivel de expresión no varía en el tipo celular o tejido de interés, en idéntico estado fisiológico o patológico al que sea objeto de estudio y, además, en las mismas condiciones experimentales del ensayo (Ferguson et al., 2005).

Frente a este estado de cosas, la alternativa al empleo de entidades proteicas singulares como control de carga es la normalización basada en el uso del contenido proteico total, revelado por sustancias que tiñen las proteínas. De este modo, la intensidad de tinción obtenida se corresponde con la cantidad realmente presente en cada calle. Ejemplos de estas sustancias son: SYPRO® Ruby y Amido Black (Aldridge et al., 2008), Ponceau S (Romero-Calvo et al., 2010) y azul brillante de Coomassie (Welinder y Ekblad, 2011). Más recientemente se han desarrollado tecnologías sin tinción, consistentes en la unión de un compuesto fluorescente a los residuos de triptófano de las proteínas, de tal manera que emiten una fluorescencia característica cuando son expuestas a luz ultravioleta (Gürtler et al., 2013). Sin embargo, esta última alternativa, anunciada como más fiable, limpia y versátil que las opciones basadas en tinciones, presenta unos costes elevados ya que precisa de unos geles y un equipo de visualización específicos.

Por todo lo expuesto, con el objetivo de poder llevar a cabo la normalización de la señal de proteínas detectadas mediante WB, decidimos investigar la fiabilidad del uso de la β -actina y de la tinción de la proteína total con azul brillante de Coomassie. Nuestro propósito final era el de encontrar un método fiable y aplicable a nuestras condiciones habituales de trabajo, que pudiera ser aplicado en futuros estudios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y obtención de fracciones subcelulares

Para los ensayos incluidos en este artículo se emplearon muestras proteicas procedentes de biopsias realizadas a tres pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal en el Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUO), previa firma del correspondiente consentimiento informado por parte de los pacientes y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia, tal como contempla la Ley 14/2007 de Investigaciones Biomédicas. El interés fundamental de nuestro grupo de investigación es encontrar biomarcadores (proteínas o ciertos motivos de glicosilación) que ayuden a mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de los pacientes con cáncer colorrectal.

Los especímenes de tejido colorrectal fueron sometidos a homogeneización mecánica en Tris-HCl. Posteriormente, fueron sometidos a una centrifugación inicial para eliminar componentes residuales y a una serie posterior para obtener una fracción enriquecida en proteínas asociadas a membranas celulares y otra en proteínas citoplasmáticas (Mariño-Crespo, 2016). Por último, se determinó la concentración proteica de las muestras mediante el método del ácido bicinónico (BCA).

Western blotting

La separación de las proteínas contenidas en las muestras empleadas se llevó a cabo mediante electroforesis monodimensional en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Como tampón de electroforesis se utilizó Tris 25 mM, glicina 0,19 M y SDS al 0,1% (p/v) en H₂O destilada (H₂Od)(pH 8,3). La separación tuvo lugar a 180 V en un Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad), hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el final del gel.

Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de PVDF de 0,45 µm de tamaño de poro (Hybond™-P, Amersham). Como tampón se utilizó Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 10% (v/v) en H₂Od. La transferencia tuvo lugar a 120 V durante 80 min.

Para llevar a cabo el *immunoblot* con β-actina, la membrana se bloqueó con una solución compuesta por leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y polisorbato 20 (Tween-20) al 0,05% (v/v) en tampón PBS. Posteriormente se incubó la membrana durante 1 h con un anticuerpo anti-β-actina (Sc-47778, Santa Cruz Biotechnology; dilución 1/1.500 en solución de bloqueo). A continuación se lavó la membrana con PBS y se incubó

durante 1 h con un anticuerpo secundario (ab97040, Abcam; dilución 1/15.000 en solución de bloqueo). Por último, se llevó a cabo el revelado quimioluminiscente de la membrana con Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad).

Tinción con Coomassie

Tras el inmunoblot de la membrana, o simplemente tras la transferencia, se realizó la tinción de proteínas mediante una solución compuesta por azul brillante de Coomassie R-250 al 0,1% (p/v), metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 9% (v/v) en H₂Od. La tinción se llevó a cabo en un tiempo aproximado de 5 min, procediendo a continuación al lavado de la membrana con una solución compuesta por metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% en H₂Od. De esta manera se elimina el colorante unido inespecíficamente a la membrana (el fondo de la membrana queda sin color) y únicamente aparecen teñidas las bandas proteicas.

Análisis de imagen

La toma de imágenes se llevó a cabo con un equipo ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad), mientras que su procesado se realizó mediante el *software* Image Lab 4.1 (Bio-Rad). El cálculo de la intensidad de la tinción con Coomassie consistió en trazar un rectángulo en cada calle con la herramienta Volume Tools. Estos rectángulos deben ser del mayor tamaño posible con el objetivo de conseguir la máxima representatividad, pero sin

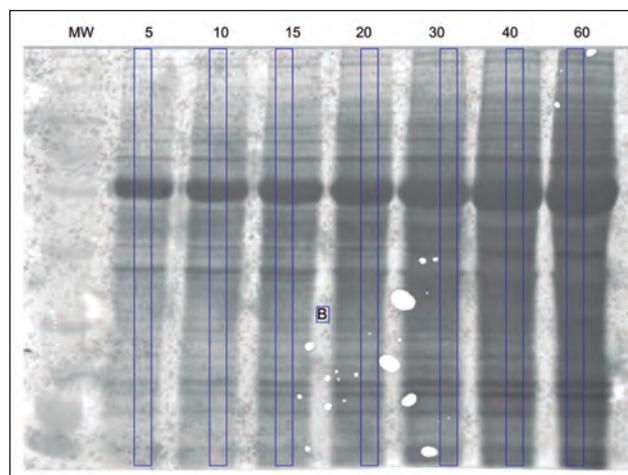


FIGURA 1. Selección de áreas representativas de la intensidad de cada calle y del fondo inespecífico (B) de una membrana teñida con azul brillante de Coomassie. Las cifras en la parte superior indican la cantidad teórica de proteína cargada en cada calle, en µg. MW, marcador de masa molecular.

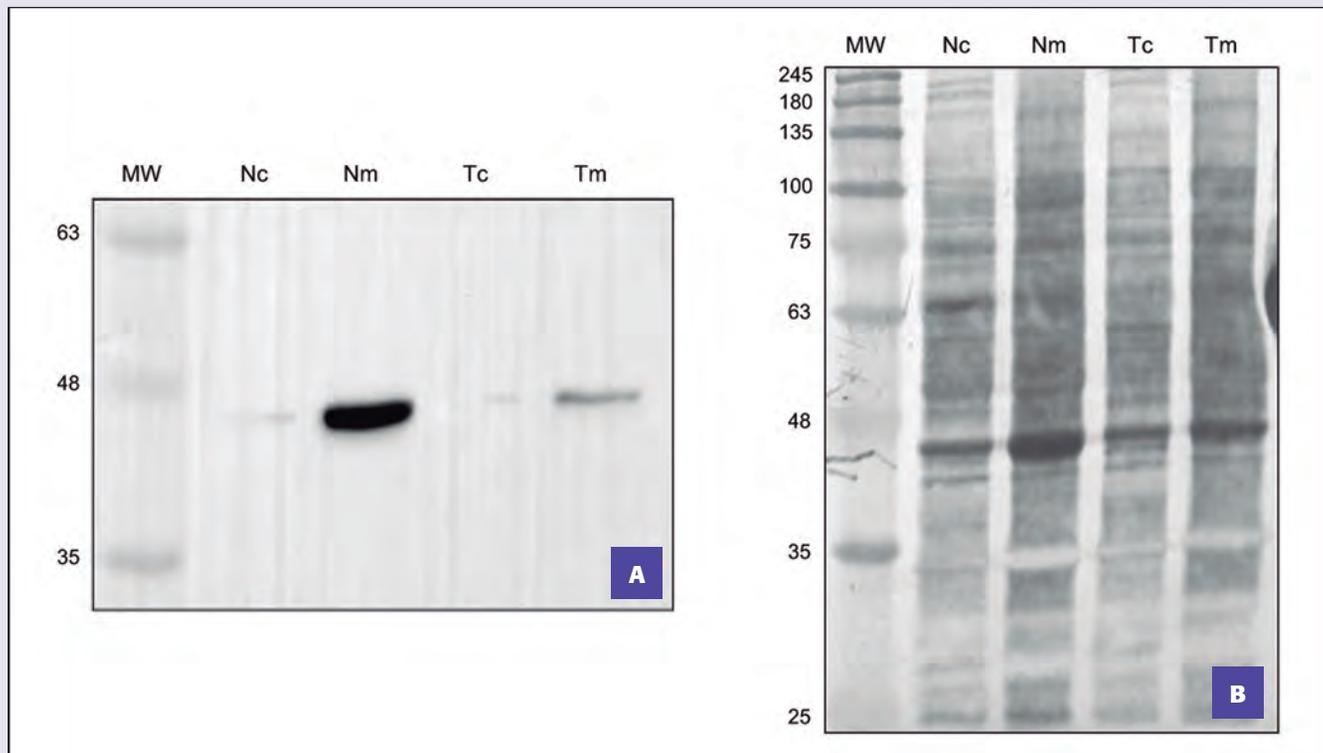


FIGURA 2.A: expresión de β -actina en fracciones subcelulares de tejido sano y tumoral procedentes de pacientes con cáncer colorrectal. **B:** tinción de proteínas totales en la misma membrana con azul brillante de Coomassie. MW, marcadores de masa molecular (en kDa); Nc, fracción de proteínas citoplasmáticas del tejido sano; Nm, fracción de proteínas de membrana del tejido sano; Tc, fracción de proteínas citoplasmáticas del tejido tumoral; Tm, fracción de proteínas de membrana del tejido tumoral.

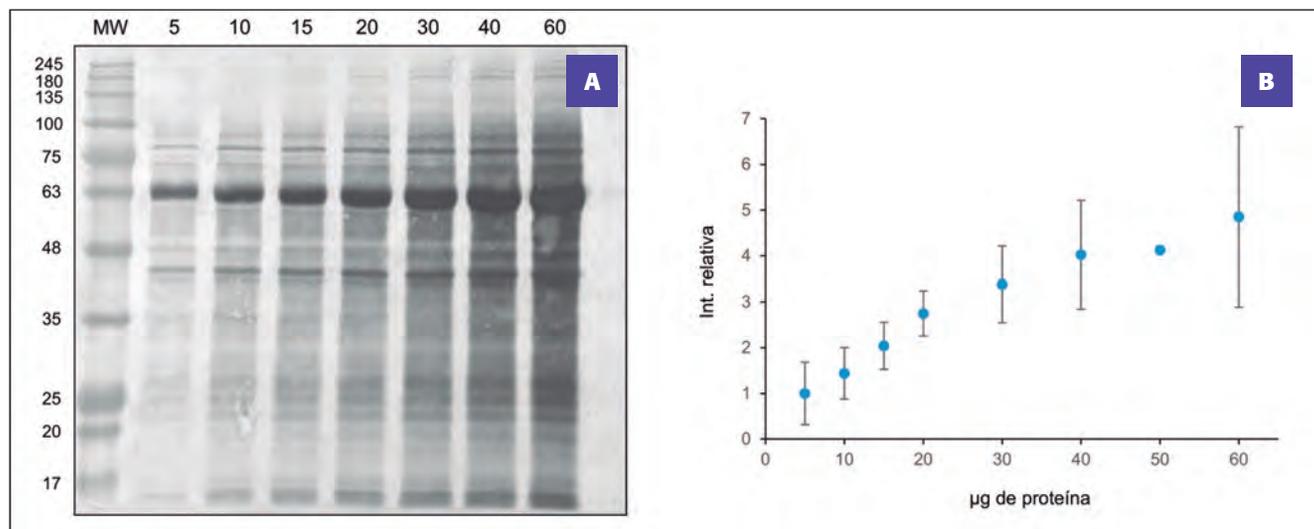


FIGURA 3.A: tinción con azul brillante de Coomassie de una de las membranas utilizadas para el estudio de la linealidad de su intensidad con respecto a la cantidad de proteína. Las cifras en la parte superior de la imagen indican la cantidad teórica de proteína cargada en cada calle, en μg . **B:** representación gráfica de la relación entre la cantidad de proteína presente en cada calle y la intensidad relativa de la tinción con azul brillante de Coomassie. Se indica la media \pm desviación estándar de tres ensayos (excepto para el punto de 50 μg , que representa un único ensayo). La intensidad relativa es el cociente de la intensidad media para cada punto y la menor intensidad medida. MW, marcador de masa molecular (en kDa).

salirse del carril y evitando manchas o defectos generados durante la transferencia o la tinción (fig. 1). El área y la forma de los rectángulos fue la misma para cada calle de una misma membrana, de tal manera que se pudiesen hacer comparaciones entre ellas. Además, a la intensidad de todas las calles se le sustrajo el fondo inespecífico seleccionando previamente un área representativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Normalización basada en la expresión de β -actina

Primeramente se analizó la viabilidad del uso de la expresión de β -actina inmuno-detectada para normalizar la señal de proteínas en WB. Como nuestro interés era utilizar diferentes fracciones subcelulares, se incluyeron 20 μg de proteína de muestras de fracción citoplasmática y de membranas. Tras la electroforesis, la transferencia y el revelado de β -actina, la membrana fue teñida con Coomassie. Los resultados se muestran en la figura 2.

El WB de β -actina (fig. 2A) mostró una aparente alta expresión de la proteína en la muestra de proteínas de membrana del tejido sano (Nm), moderada en la fracción de membrana del tejido tumoral (Tm) y baja en la fracción

citoplasmática de tejido sano (Nc) y tumoral (Tc). Por su parte, la tinción de la misma membrana con Coomassie (fig. 2B) mostró una aparente mayor intensidad de señal (por tanto, mayor cantidad de proteína) en las calles Nm y Tm que en las calles Nc y Tc, aunque teóricamente se había cargado la misma cantidad de proteína para todas las muestras. Es decir, la carga proteica real fue distinta a la carga teórica, lo cual constata la dificultad de depositar la misma cantidad de proteína en cada calle. Esta limitación es debida a las inevitables imprecisiones técnicas y humanas que conllevan la determinación de la concentración proteica y el proceso de carga del gel.

A la vista de estos resultados, no consideramos necesario cuantificar la intensidad de señal de la β -actina, pues resulta evidente que la gran diferencia de intensidad de la proteína en las cuatro muestras analizadas no es achacable a la carga proteica ligeramente desigual que se aprecia en la membrana teñida con Coomassie. Del simple estudio visual de ellas se puede concluir que la proteína β -actina se reparte de forma desigual entre las fracciones subcelulares utilizadas (principalmente se localiza en la fracción de membranas), lo cual la inhabilita para ser utilizada en la normalización de la señal de otras proteínas en WB en los que se empleen estas fracciones.

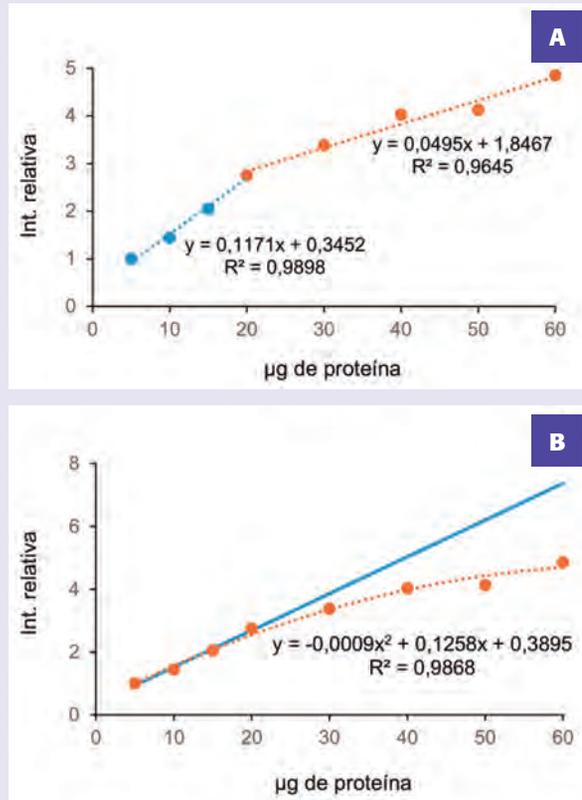


FIGURA 4. Representación gráfica de la relación entre la cantidad de proteína presente en la membrana y la intensidad de tinción con azul brillante de Coomassie. A: visualización de un aparente patrón lineal bifásico, con la ecuación de las rectas de regresión y su coeficiente R². B: comparación de la curva de ajuste que mejor describe la relación entre las dos variables (línea punteada naranja) con la recta que indicaría una relación lineal perfecta entre ellas (línea azul). La intensidad relativa es el resultado del cociente de la intensidad media para cada punto entre la menor intensidad medida.

Normalización basada en la intensidad de la tinción con azul brillante de Coomassie de la membrana de western blot. Estudio de su linealidad

Debido a que el azul brillante de Coomassie se une específicamente a las proteínas, se procedió a analizar la única incertidumbre que, a nuestro juicio, presenta este método de normalización de la señal de proteínas en WB: la linealidad de la relación cantidad de proteína/intensidad de señal. Para ello se llevó a cabo un estudio por triplicado consistente en cargar siete calles de geles SDS-PAGE con cantidades de proteína crecientes (de 5 a 60 μg , procedentes de la fracción de proteínas citoplasmáticas). A continuación se separaron las proteínas electroforéticamente y se transfirieron a una membrana de PVDF, que fue posteriormente teñida con Coomassie. Para finalizar, se cuantificó la intensidad de tinción de cada calle.

En la figura 3A se muestra, a modo de ejemplo, una imagen representativa de los ensayos llevados a cabo. Se observa a simple vista como, a medida que aumenta la cantidad de proteína, también lo hace la intensidad del color. En la figura 3B se representa gráficamente el resultado de los tres ensayos, mostrando la media y desviación estándar para todas las cantidades de proteína analizadas. Por simplicidad, se decidió representar la intensidad relativizada a la menor de ellas, la detectada con 5 μg de proteína. Esta gráfica confirma que la intensidad del color aumenta a la par que la cantidad de proteína cargada.

En la figura 4 se muestra la auténtica naturaleza de la relación entre la cantidad de proteína en la membrana y la intensidad de su tinción con Coomassie. El modelo de regresión lineal que mejor describe la relación entre ambas variables sigue un patrón lineal bifásico con un punto de inflexión a los 20 μg (fig. 4A). Desde otro punto de vista, se puede afirmar que la relación entre las dos variables es lineal entre 5 y 20 μg de proteína ($R^2 = 0,989$), mientras que con cantidades superiores la intensidad se satura progresivamente hasta alcanzar un máximo aparente en torno a los 60 μg . De hecho, la expresión matemática más certera de la relación entre ambas variables en todo el rango ensayado siguió un modelo cuadrático que, hasta 20 μg de proteína cargada, resultó indistinguible de un modelo lineal, mientras que a partir de esta cantidad se alejó cada vez más de él (fig. 4B).

Nuestros resultados indican que, a partir de 20 μg de proteína, el color generado por la tinción no aumenta proporcionalmente con la cantidad de proteína, sino que lo hace en menor

medida, confirmando así lo apuntado previamente por Welinder y Ekblad en 2011. Una vez pasado este punto de inflexión, por tanto, la intensidad normalizada de una proteína de interés será infravalorada. Este efecto puede deberse a que a partir de 20 μg de proteína quede una superficie activa en la membrana insuficiente para fijar en su totalidad ulteriores incrementos de proteína, lo cual es compatible con la observación de que los restos no transferidos de ésta en los geles aumentan a la par que lo hace la cantidad cargada en ellos (resultados no mostrados). Otra posible causa explicativa es que se produzca un amontonamiento de proteínas sobre los puntos activos de la membrana, que impida a las de capas inferiores ser accesibles a la solución de tinción, de modo que no contribuirían a la generación de color.

En conclusión, nuestros resultados indican que, en nuestras condiciones experimentales, no se debe comparar la expresión de una proteína en una calle en la que se carguen de 5 a 20 μg de proteína, con otra en la que se carguen más de 20 μg . Sin embargo, a pesar de la saturación de la intensidad del color que se produce cuando se supera este umbral, a nuestro juicio sería admisible la comparación entre calles con entre 20 y 60 μg de proteína, ya que en este rango también existe una relación lineal aceptable. Es posible que con otras condiciones de transferencia y, sobre todo, con membranas de tamaño de poro diferente a 0,45 μm , el rango de linealidad de la señal de la tinción con Coomassie sea otro. Desde nuestro punto de vista, cada investigador debería llevar a cabo comprobaciones como las descritas en este trabajo antes de comenzar a aplicar este método (u otros) para realizar WB cuantitativo.

Por último, queremos puntualizar que este procedimiento, al estar basado en la tinción de la membrana, únicamente debe ser utilizado en el caso de inmunoblot con revelado quimioluminiscente, evitando por tanto los revelados cromogénicos, que generan un color que se sumaría al provocado por la tinción con Coomassie. Por otra parte, este método de normalización es análogo al empleo de proteínas control. Consiste en calcular el cociente entre la intensidad de la banda o bandas de la proteína de interés en el inmunoblot y la intensidad total de su calle en la membrana teñida con azul brillante de Coomassie.

BIBLIOGRAFÍA

4. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT y Weiler IJ (2008). The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* 172: 250-254.
5. Alexander M, Curtis G, Avruch J y Goodman HM (1985). Insulin regulation of protein biosynthesis in differentiated 3T3 adipocytes. Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 260: 11978-11985.
6. Álvarez-Chaver P, Rodríguez-Piñeiro AM, Rodríguez-Berrocal FJ, Martínez-Zorzano VS y Páez de la Cadena M (2007). Identification of hydrophobic proteins as biomarker candidates for colorectal cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 529-540.
7. Dittmer A y Dittmer J (2006). Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27: 2844-2845.
8. Eisenberg E y Levanon EY (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet* 29: 569-574.
9. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ y Banks RE (2005). Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* 5: 566-571.
10. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K, Kohn JE y Posch A. (2013). Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 433: 105-111.
11. Liu NK y Xu XM (2006). β -tubulin is a more suitable internal control than β -actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury. *J Neurotrauma* 23: 1794-1801.
12. Mariño-Crespo O (2016). Tesis doctoral "Expresión del antígeno β (2,6) sialilado CDw75 en el proteoma colorrectal humano: identificación de proteínas portadoras y estudio de su relación con la progresión del cáncer colorrectal". Universidad de Vigo.
13. Moskowitz PF y Oblinger MM (1995). Transcriptional and post-transcriptional mechanisms regulating neurofilament and tubulin gene expression during normal development of the rat brain. *Mol Brain Res* 30: 211-222.
14. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O y de Medina FS.(2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401: 318-320.
15. Welinder C y Ekblad L (2011). Coomassie staining as loading control in western blot analysis. *J Proteom Res* 10: 1416-1419.



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE ECONOMÍA
EMPREGO E INDUSTRIA



CCT
INSTITUTO CULTURA CIENCIA Y TECNOLOGIA