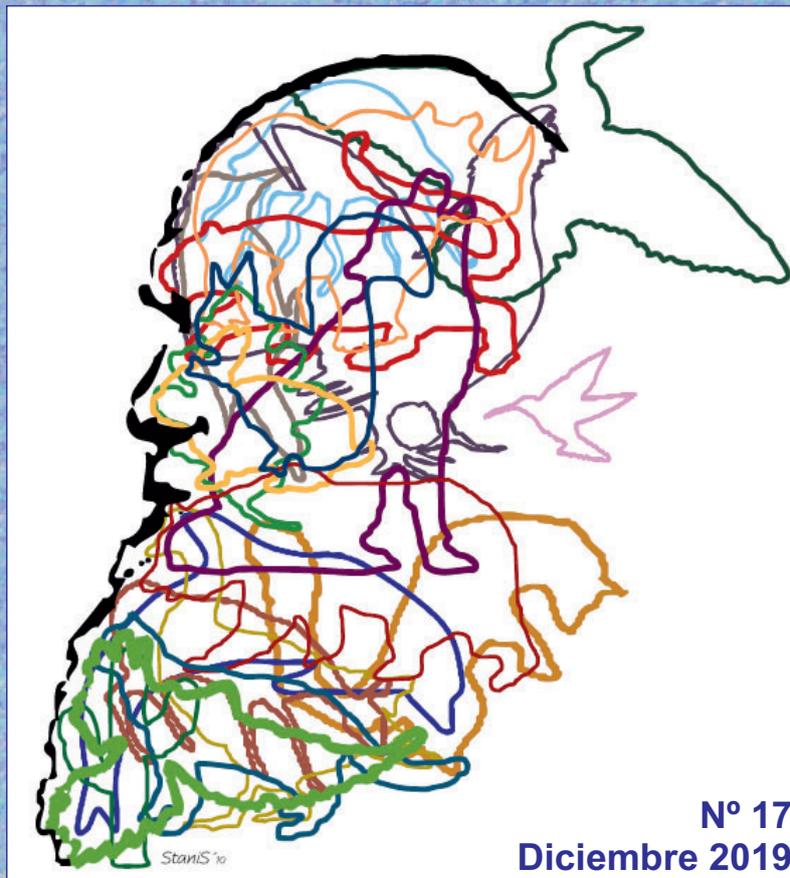


# AmbioC iencias



REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA E INNOVACIÓN DOCENTE



Nº 17  
Diciembre 2019

★ 1968 ★



★ 2019 ★

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES. UNIVERSIDAD DE LEÓN



## Consejo de Redacción

### Director:

Juan Manuel Nieto Nafría

Catedrático de Universidad del Área de Zoología

### Secretaria:

Raquel Alonso Redondo

Vice-Decana de la Facultad de CC. Biológicas y Ambientales

### Miembros:

José Luis Acebes Arranz

Catedrático de Universidad del Área de Fisiología Vegetal

Francisco Javier Rúa Aller

Profesor Titular del Área de Bioquímica y Biología Molecular

María Paz Herráez Ortega

Catedrática de Universidad del Área de Biología Celular

Delia Fernández González

Profesora Titular del Área de Botánica

Estanislao de Luis Calabuig

Catedrático de Universidad del Área de Ecología

Luis Mariano Mateos Delgado

Catedrático de Universidad del Área de Microbiología

Luis E. Sáenz de Miera Carnicer

Profesor Titular del Área de Genética

Edita: Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León

Colabora: Área de Publicaciones de la Universidad de León.

Maquetación: Ana Alonso Simón.

© Universidad de León

© Los autores

ISSN: 1988-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa)

Dep. Legal: LE-903-07



**En portada:**

Logotipo diseñado por el Dr. Estanislao de Luis Calabuig inspirado en la figura de Sir Charles Darwin.

## ÍNDICE

### Editorial

Consejo de Redacción ..... 3

### A fondo

#### **Asma profesional: definición, tipos y etiopatogenia**

Alicia Armentia Medina.....4

### Poniendo en claro

#### **Edición genética por CRISPPR-Cas y sus aplicaciones en la mejora de cultivos**

Sergio Melero Royo, Nicole Martínez-García y María Luz Centeno Martín.....14

#### **Aplicaciones del sistema CRISPPR-Cas9 a la modificación genética en animales domésticos**

Nicole Martínez-García, Sergio Melero Royo, Margarita M. Marqués, Yolanda Bayón .....32

### Siguiendo la pista

#### **Exhumación en Canseco (Cármenes, León): Estudio antropológico y paleopatológico**

Miriam Serralvo González .....46

### Baúl de la ciencia

#### **La búsqueda del sensor celular del oxígeno, un camino al Nobel**

María del Carmen Marín Vieira .....57

<b>Fitosociología, Fitoclimatología y Fitogeografía: Tres ciencias en un mismo camino</b>	
Ángel Penas Merino, Sara del Río González .....	72
<b>Uno de los nuestros</b>	
<b>Margalef: el último naturalista</b>	
Estanislao Luis Calabuig .....	87
<b>Ambiólogos de aquí</b>	
<b>Orinoco: indígenas, peces y mercurio</b>	
Luis Eduardo Pérez Álvarez.....	100
<b>Mi proyecto de tesis</b>	
<b>Análisis metodológico para la estimación de la vulnerabilidad por inundaciones. Ejemplo de aplicación en el municipio de Ponferrada (León. España)</b>	
Laura Tascón González .....	104
<b>Educando en lo nuestro</b>	
<b>La visión de los alumnos acerca de las competencias generales y transversales de los Grados en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales de la Universidad de León</b>	
Marta Eva García-González .....	107
<b>De todo un poco</b>	
<b>Noticias de actualidad</b> .....	117

## EDITORIAL

Editorial es «Artículo no firmado que expresa la opinión de un medio de comunicación sobre un determinado asunto» según el *Diccionario de la Lengua Española* de la Real Academia Española; definición que no siempre se ha seguido en esta revista —que es un medio de comunicación—, pero que queremos seguir ahora, en el bien entendido que el «medio» está personificado en quienes nos ocupamos de la gestión o dirección de la revista, el Consejo de Redacción de Ambociencias.

Editorial que tratará dos asuntos, uno particular y otro general.

El volumen décimo séptimo de *Ambociencias* prosigue en la ruta de objetivos que la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León se fijó al ponerla en marcha: 1) permitir la actualización de los conocimientos en algunos aspectos de las ciencias que se incluyen en lo que ampliamente podemos considerar biología y ciencias ambientales, incluyendo la biotecnología; y 2) permitir que jóvenes egresados firmasen una publicación científica con sistema de evaluación previa. En esa ruta inicial han ido confluyendo otros caminos hacia objetivos añadidos que se iban fijando: comentar obras de importancia, exponer logros en innovación docente, e informar del acontecer de la Facultad, reforzando así la vinculación de quienes han pasado por ella.

Proseguimos en ruta y lo podemos hacer gracias a la colaboración decidida y entusiasta de quienes firman los artículos que componen este número.

La conservación del medio ambiente está a diario en las páginas de los periódicos, en las emisiones de radio y de televisión, llega al teatro y al cine, sobre todo en lo que se refiere a la conservación del medio de la Tierra como un todo. Desde estas páginas nos unimos a ese deseo de conservación.

Nos unimos, y reclamamos adecuadas políticas de conservación reivindicando la necesidad de un conocimiento pleno de las actuaciones que impiden una adecuada conservación, y de los fenómenos que la interfieren, y del establecimiento de modelos que nos informen de cómo habrán de discurrir los fenómenos futuros. Políticas vehementes como se espera de políticos de raza, y políticas eficaces, para lo cual deben estar sustentadas en una amplia base científica, alejadas de los «ismos», y que sean muy bien explicadas a los ciudadanos, pues éstos habrán de implicarse directamente en su implementación, a pesar de los costes personales que ello conllevará posiblemente. En fin, estudio científico, divulgación, evaluación de posibles actuaciones, información, y por último implicación.

## A FONDO

### Asma profesional: definición, tipos y etiopatogenia

Alicia Armentia Medina

Servicio de Alergia, Hospital Universitario Río Hortega, calle Dulzaina 2, 47012 Valladolid

#### Resumen

Según los últimos análisis epidemiológicos, una de cada 5 personas alérgicas en los países desarrollados sufre alergia laboral. Existen más de 400 productos implicados en esta patología. Las causas y factores de riesgo son diversas y muchos pacientes afectados trabajan en la industria agroalimentaria o son profesionales sanitarios, agrícolas y de la limpieza. Los principales síntomas clínicos se pueden asociar a rinitis y dermatosis profesionales.

En la mayoría de los casos de asma ocupacional, el paciente tiene que dejar su trabajo o requerir cambios sustanciales en el entorno laboral y de vida. El conocimiento profundo de las causas desencadenantes y el desarrollo de una inmunoterapia específica más precisa, podrán mejorar a los pacientes que la sufren.

**Palabras clave:** Asma profesional, alérgenos, asma del panadero, inmunoterapia, alergia a alimentos.

#### Definición

El asma ocupacional (OA) y el asma exacerbada en el trabajo (WEA), denominadas colectivamente como asma relacionada con el trabajo (WRA), han sido reconocidas como una de las enfermedades pulmonares más prevalentes en el mundo industrializado y una de las más comunes en los países emergentes (Trivedi *et al.* 2017).

El OA es el asma causada por las condiciones del lugar de trabajo y se subdivide en OA inducida por un alérgeno sensibilizante (alérgica) y OA inducida por irritantes (no alérgica) (Friedman-Jiménez *et al.* 2015, Trivedi *et al.* 2017). El alérgeno o sustancia sensibilizante suele tener un peso molecular superior a 10 kilodaltons (kDa), y los de peso molecular inferior a 2 kDa, en general, son productos químicos que actúan como haptenos, es decir que no inducen por sí mismos la formación de anticuerpos, pero al unirse a una proteína transportadora estimulan una respuesta inmunitaria y pueden provocar síntomas sin latencia. El asma ocupacional provocada por agentes sensibilizantes tiene un periodo de latencia de semanas a años y puede acompañarse de rino-conjuntivitis y derma-

Forma de mencionar este artículo: Armentia Medina, A. 2019, Asma profesional: definición, tipos y etiopatogenia. *AmbioCiencias*, 17, 4-13. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

titis. La rinitis ocupacional es un indicador de severidad de este tipo de asma. Otros factores que predisponen hacia el OA son la atopía, el tabaquismo, factores genéticos y sexo femenino.

El asma exacerbada en el trabajo (WEA) es el asma que empeora o se incrementa durante el periodo laboral, pero no ha sido causada inicialmente por las condiciones del lugar de trabajo. Para su correcto diagnóstico se han de conocer antes cuales son los alérgenos que existen en el lugar donde la persona trabaja, muchas veces ocultos o inesperados.

Aunque el asma relacionada con el trabajo rara vez es fatal, los pacientes con WEA frecuentemente experimentan una pérdida excesiva de tiempo en el trabajo, una discapacidad grave específica por el lugar de trabajo, pérdida de ingresos, pérdida de empleo y como consecuencia, problemas psicosociales y financieros relacionados (Fig. 1). Se ha demostrado que existen más de 400 agentes ambientales en los puestos de trabajo que pueden causar asma exacerbada (WEA), éstos se han clasificados en base a su peso molecular y a sus propiedades alergénicas e irritantes.

La forma mejor descrita del asma profesional por irritantes es el síndrome de disfunción reactiva de la vía aérea o RADS, que ocurre en las 24 horas siguientes a una sola exposición a elevadas concentraciones de un producto irritante.

**ASMA LABORAL:** Limitación variable al flujo aéreo por causas laborales y no por estímulos fuera del trabajo.

- **INMUNITARIA:** Mediado por **IgE** o no, con periodo de latencia
- **NO INMUNITARIA:** Asma por irritantes, no existe periodo de latencia.
- **ASMA preexistente** que se **EXACERBA** por la actividad laboral.

Figura 1. Definición y origen del asma ocupacional o profesional.

El diagnóstico de WEA requiere la confirmación de un diagnóstico de asma, más la evidencia de que el asma ha sido causada o agravada debido a las condiciones del lugar de trabajo. La precisión del diagnóstico es importante porque, un diagnóstico excesivo o un diagnóstico impreciso de WEA, pueden ser problemáticos para el paciente.

Los síntomas clínicos solo tienen una sensibilidad y especificidad justas

para la OA. Si es posible, la evaluación diagnóstica también debe incluir evidencias objetivas con pruebas funcionales, de provocación específica e inmunológica (Fig. 2).

Asma ocupacional INMUNITARIO			No Inmune
Clínica	Mediado por IgE	No IgE	Irritantes
Latencia	Largo	Más corto	Exposiciones repetidas
Prevalencia	<5%	>5%	Desconocida
Predisponentes	Atopia, tabaco	Desconocida	¿Atopia?
<b>Histología</b>			
Descamación Epitelio	++	++	+++
Fibrosis	++	++	+++
Membraba basal alterada	++	++	++
Eosinófilos	+++	+++	+/-
Linfocitos	++	++	+/-

Figura 2. Características clínicas de los diferentes tipos de asma ocupacional. En verde se señalan las características más importantes que diferencian el asma de origen inmunitario del no inmunitario.

En esta revisión se describirán diferentes causas que provocan asma ocupacional como alérgenos y otros factores agravantes y desencadenantes, haciendo especial referencia al asma profesional más prevalente (asma del panadero), pero también al asma ocupacional relacionada con la industria alimentaria, el causado por el látex en el entorno sanitario, el asociado a síntomas de rinitis y la dermatosis que pueden precederlo o estar asociados (Gómez *et al.* 1990; Panzani *et al.* 2008; Sastre *et al.* 2003; Leonart *et al.* 1992; Quirce *et al.* 2004).

### Tipos de asma profesional y etiopatogenia

Un 3,4% de los españoles trabajan en el sector agroalimentario lo que hace que el asma por alimentos sea un fenómeno cada vez más relevante en la población adulta y productiva. Dentro de este sector, el asma del panadero (BA) es la

enfermedad respiratoria profesional más frecuente en los países occidentales y la primera causa de asma ocupacional en España. En Castilla y León, concretamente en Valladolid, se ha observado a partir de una base de datos de 18.726 pacientes (procedentes del Hospital Universitario Río Hortega) que esta enfermedad constituye el 8,2% de las causas de asma extrínseco y el 52,5% de los diagnósticos de asma ocupacional.

Le siguen en frecuencia el asma por manipulación de alimentos (46%), el producido por ácaros de almacén en manipuladores de alimentos o piensos (18%), el de los pintores (5.7%) y el de los trabajadores de la madera (2%) (Fig. 3).



Figura 3. Casuística del asma profesional en Valladolid: asma del panadero (52,5%), asma del agricultor (17,9%) y asma asociado a diferentes industrias agro-alimentarias (15,5%).

### Asma del panadero

El asma del panadero (BA) se debe a la inhalación diaria de harina de trigo en el entorno de trabajo, afectando entre el 1% y el 10% de los trabajadores de la industria panadera. El diagnóstico de BA se basa en la provocación bronquial con trigo, una técnica de alto riesgo para los pacientes.

Los alérgenos implicados en el asma del panadero han sido suficientemente descritos, caracterizados y purificados en los últimos 10 años (Safi *et al.* 2019), por lo que parecería que no queda mucho por descubrir de esta enfermedad conocida desde hace siglos. Sin embargo, no sabemos si los alérgenos son los mismos que afectaban a los panaderos del pasado o si aparecen diferencias de sensibilización entre pacientes de diversos países. ¿Existe la posibilidad de un fallo en los mecanismos inmunológicos de tolerancia? ¿o unos alérgenos son más agresivos que otros? Sin duda ha habido un cambio en la materia prima usada en

panadería, debido a las nuevas tecnologías agro-alimentarias, por lo que ha sido necesario reevaluar los alérgenos implicados en esta enfermedad.

En los últimos años se han utilizado pesticidas cada vez más dañinos para los fitófagos que provocan las plagas del cereal, por lo que actualmente es muy difícil encontrar harinas contaminadas por antígenos parasitarios. No es fácil encontrar parasitación en harinas y otras fuentes alimentarias debidas por ejemplo a los ácaros, ni en leguminosas causadas por coleópteros como el gorgojo de las lentejas, *Bruchus lentis* (Armentia et al. 2006). Lepidópteros, como orugas y procesionarias, sí que provocan asma profesional en piñeros y leñadores (Vega et al. 2004) (Fig. 4).



Figura 4. El asma profesional de los trabajadores agrícolas puede ser causada por diferentes parásitos. En el cereal los más frecuentes son el chinche del grano o *Eurygaster austriaca* y el lepidóptero *Ephestia* (Armentia et al. 2006).

Por otro lado, la presencia de contaminantes como bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, naftalenos, cadmio, mercurio y plomo, entre otros tóxicos, ha ido en aumento y pueden haber estimulado la síntesis de proteínas de defensa de las plantas.

El procesado industrial de las harinas usadas en el pan que consumimos (en las que no solo hay trigo, sino gran contenido de otros cereales, frutos secos, otras semillas y leguminosas) ha variado con el tiempo, siendo precisa la adición de cada vez más enzimas fúngicas o sintéticas. Por otra parte, ciertos alérgenos de defensa de las plantas, como las proteínas transportadoras de lípidos (LTP), son la principal causa de sensibilización y de reactividad cruzada inmunológica

entre alimentos (frutos secos, leguminosas y/o semillas, frutos de rosáceas y de otras familias de plantas, hortalizas y otras partes de los vegetales).

En las alergias ligadas al trigo se distinguen dos fuentes antigénicas principales: trigo, *Triticum aestivum* (usado para fabricar harinas y productos de panadería) y “trigo duro” *Triticum durum* (utilizado como base en la elaboración de pastas, pizzas, bulgur, sémolas y cuscús). La sensibilización a estos cereales se manifiesta no solo con episodios asmáticos, sino también, con una amplia gama de síntomas y síndromes clínicos, como exacerbaciones de dermatitis atópica, anafilaxia inducida por el ejercicio, esofagitis eosinofílica (EA). Recientemente se ha caracterizado la LTP de *Triticum durum* (Tri tu 14) y se ha evaluado su respuesta en pacientes con asma del panadero y pacientes con alergia alimentaria (Safi *et al.* 2019), demostrándose que Tri tu 14 está ligado a la alergia alimentaria y la anafilaxia relacionada con el ejercicio.

La proteína de transferencia de lípidos de trigo (LTP) Tri a 14 ha sido descrita como alérgeno principal en esta patología. Un estudio llevado a cabo con 55 pacientes del Hospital Río Hortega de Valladolid, con el objetivo de caracterizar Tri a 14 como marcador de la alergia del panadero (BA), y así evitar la provocación bronquial con trigo, ha dado resultados positivos en el 82% de los pacientes. Así ha quedado demostrado, que la medición de Tri a 14 se podría utilizar como marcador de dicha enfermedad (Armentia *et al.* 2015).

Existe reactividad cruzada entre LTPs de melocotón (Pru p 3) y las LTPs de trigo duro, (Tri tu 14 en particular). Por el contrario, la reactividad cruzada entre Pru p 3 y Tri a 14 (relacionado con BA) es baja. La estrecha asociación en la sensibilización entre Tri tu 14 y Pru p 3 y la reactividad cruzada frente ambas proteínas transportadoras de lípidos no específicas (nsLTPs), puede explicarse por los sitios específicos de unión conservados en ambas moléculas. Aunque Tri tu 14 muestra una secuencia de aminoácidos muy similar a la de Tri a 14 (48%) y a la de Pru p 3 (52%), parece que Tri tu 14 y Pru p 3 comparten una mayor proporción de aminoácidos conservados en su superficie, lo que puede definir la reactividad cruzada de los epítomos conformacionales de IgE. En este caso, se deduce que la reactividad cruzada es debida a la similitud del lugar de unión para la IgE en superficie y no a la secuencia lineal de aminoácidos (Fig. 5).

Las plantas son la base de alimentación de animales, insectos y microorganismos (hongos, bacterias...) y del ser humano. La evolución ha favorecido la selección o la aparición de mecanismos equivalentes a una respuesta de hipersensibilidad que permiten su defensa, acumulando sustancias antimicrobianas y produciendo proteínas relacionadas con la patogenicidad, cuya síntesis está regulada por “genes de defensa”. Algunos investigadores han demostrado que, en

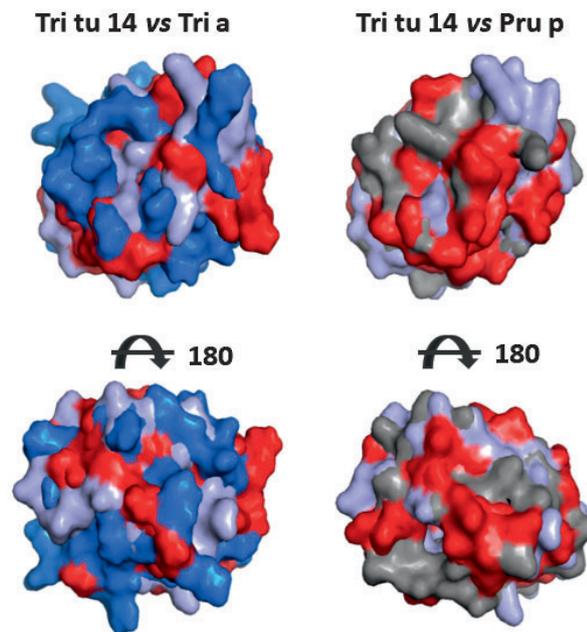


Figura 5. Moléculas alergénicas implicadas en el asma profesional por inhalación de trigo panificable (Tri a 14 del *Triticum aestivum*) y el utilizado para la industria de las pastas alimenticias (Tri tu 14 *Triticum durum*). (Tomado de Hela *et al.*, 2019).

condiciones de estrés, estos genes inducen el aumento de producción de proteínas como las LTPs, lo cual implica un mayor riesgo de reacciones alérgicas en pacientes sensibilizados. Con los años se intuyó que de la manipulación de dichos genes podrían obtenerse semillas de vegetales más resistentes a plagas. Por ello el hombre ha ido modificando sus cultivos, junto con la selección natural, hasta llegar a los cultivos de especies transgénicas tan complejos de la actualidad.

Es bien conocido el hecho de que las especies transgénicas han resultado útiles para aumentar la producción agrícola y lograr reducir el uso de fertilizantes y pesticidas por lo que el asma profesional, causada por estos agentes, ha experimentado un declive. Sin embargo, en la línea de lo mencionado anteriormente, esta manipulación genética también podría ser (al menos en parte) la responsable de la respuesta en las plantas, incrementando las proteínas de defensa, cuyas repercusiones sanitarias están traduciéndose en un aumento de las reacciones de hipersensibilidad y de asma profesional (Gómez *et al.*, 2017).

Es decir, el peligro clínico que podrían provocar estas plantas transgénicas se basa en una mayor exposición de los pacientes a dichas proteínas de defensa, que en gran medida son alergénicas (por ejemplo, las que se producen para obtener resistencias a hongos o parásitos). Esta es la razón por la que cobra una gran importancia el conocimiento, la función y la caracterización de las proteínas que participan en las respuestas de las plantas y su implicación biológica en el ser humano. Se abre, de esta forma, un camino en el campo de la biotecnología hacia la manipulación genética de las plantas con el objetivo de crear cultivos resistentes a plagas, pero menos alergénicas. El descubrimiento de nuevas LTPs, como alérgenos del trigo, permite tener un objetivo claro en la terapéutica de la alergia

mediante inmunoterapia, como ya se está realizando con Pru p 3 (Gómez *et al.*, 2017).

### Otros tipos de asma industrial

La segunda causa de asma profesional está relacionada con los productos de limpieza. Carder *et al.* (2019) realizaron un amplio estudio para clasificar el asma ocupacional dentro de la red “*The Health and Occupation Research surveillance network*” con datos obtenidos entre los años 1989-2017. En dicho estudio, observaron que los casos provocados por agentes de limpieza suponían el 6% de dichas patologías respiratorias. De todos los enfermos que participaron en el análisis, el 58% padecían asma, debida sobre todo a aldehídos (30%) y clorinas (26%). Los productos de limpieza causan frecuentemente neumonitis profesional, y en los que dedican a pulimentar superficies, son responsables los productos utilizados para encerar o cristalizar. Recientemente se ha podido comprobar también una sensibilización por hippurites (bivalvos que existieron hace millones de años, en la época terciaria) que formaban parte de la superficie del material usado en el suelo.

La exposición ocupacional a gases, humos y polvo mineral, aparte de su efecto irritativo en la mucosa respiratoria, afecta al ADN de los genes que regulan la expresión del asma a través de procesos de metilación (van der Plaat, 2018). Otro factor que influye en el OA y en el WRA es la contaminación ambiental, como se ha podido comprobar en numerosos estudios epidemiológicos y de epidemias de asma (Cárdaba Arranz *et al.*, 2014).

La reactividad cruzada entre estructuras moleculares contenidas en alimentos y aeroalérgenos, da lugar a fenómenos clínicos o síndromes como por ejemplo el síndrome látex-frutas, cuya base molecular son las quitinasas o bien, la reactividad cruzada entre polen-frutas (gramíneas y rosáceas) que tienen la profilina como responsable. Este también es uno de los mecanismos implicados en el asma profesional de los trabajadores sanitarios. En todos estos casos existe una inmunoterapia específica que ha resultado de gran utilidad (Sastre *et al.*, 2003).

En muchas ocasiones el asma profesional va precedido o acompañado de rinitis y dermatitis (Callejo *et al.*, 2007, García Ortiz *et al.*, 2014) como ha ocurrido en el llamado asma de zapateros que nuestro grupo de investigación pudo estudiar. Este tipo de asma fue provocado por un biocida universal aplicado a los zapatos y diversas manufacturas de cuero, que puede afectar también a ebanistas, tapiceros, transportadores de muebles, etc. (fabricación de sofás, sillas) que contienen además y con frecuencia dimetilfumarato y ácido fórmico en su composición.

### ¿Tratamiento o prevención?

Los nuevos fármacos no han podido controlar la progresión de estas enfermedades profesionales y los intentos de tratamiento mediante inmunoterapia específica en el asma ocupacional han sido escasos. Igual que ocurre con las reacciones cruzadas entre aeroalergenos del polen y frutas, donde existe una gran diferencia según los países, también puede haber diferencias en la composición de los alimentos que manejamos o que ingerimos. De todo ello se deduce la importancia que tiene el estudio continuo de nuevas fuentes alergénicas.

El tratamiento y la prevención de la aparición o el empeoramiento de asma relacionada con el trabajo, pueden ser altamente efectivos e incluir un manejo típicamente médico óptimo (generalmente el mismo que para otros problemas de asma) o, lo que es más importante, evitar la exposición a sensibilizantes e irritantes que provoquen o agraven el asma. En la mayoría de los casos de asma ocupacional, el pronóstico mejora con la eliminación de la fuente de origen, en lugar de la reducción a su exposición. Pero esto puede requerir cambios sustanciales en el entorno laboral y de vida del paciente, ya que implicaría un cambio de trabajo o incluso de profesión, o el desarrollo de mejor y más precisa inmunoterapia específica.

En definitiva y de cara al futuro, la inmunoterapia específica, que pueda ser aplicada a los enfermos de asma ocupacional, será un gran reto para los alergólogos, con importantes repercusiones terapéuticas, sociales y económicas.

### **Bibliografía**

- Armentia, A., Lombardero, M., Blanco, C., Fernández, S. y Fernández, A. 2006. Occupational asthma in an agronomist caused by the lentil pest *Bruchus lentis*. *Allergy* 61(9): 1112-6
- Armentia, A., Garrido-Arandia, M., Cubells, N., Gómez-Casado, C. y Diaz-Perales, A. 2015. Bronchial challenge with Tri a 14 is an alternative diagnostic test for baker's asthma. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 25: 352-357
- Callejo, A., Martínez, C., Martín, G., Martín, C. y Armentia, A. 2007. Contact dermatitis from violet fragrance in a florist. *Contact dermatitis* 57(3): 191
- Carder, M.J., Seed, M.J., Money, A., Agius, R.M. y Van Tongeren, M. 2019. Occupational and work related respiratory disease attributed to cleaning products. *Occupational and Environmental Medicine* 76(8): 530-536
- Cárdaba Arranz, M., Muñoz Moreno, M.F., Armentia Medina, A. y Alonso Capital M. et al. 2014. Health impact assessment of air pollution in Valladolid, Spain. *BMJ Open* 4(10): e005999. PMID: 25326212
- Friedman-Jiménez, G., Harrison, D. y Luo, H. 2015. Occupational asthma and work-exacerbated asthma. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 36: 388-407

- García Ortiz, J.C., Vega Gutiérrez, J.M., Pérez Velesar, M.J. y Armentia Medina, A. 2014. Occupational allergic contact dermatitis from potassium metabisulfite. *Dermatitis* 25 (3): 150-1
- Gómez, L., Martín, E., Hernández, D., Sánchez-Monge, R., Barber, D., Del Pozo, V., De Andrés, B., Armentia, A., Lahoz, C., Salcedo, G. *et al.* 1990. Members of the alpha-amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Letters* 12:85-88
- Gómez, F., Bogas, G., González, M., Campo, P., Salas, M., Díaz-Perales, A., Rodríguez, M.J., Prieto, A., Barber, D., Blanca, M., Torres, M.J. y Mayorga, C. 2017. The clinical and immunological effects of Prup3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clinical & Experimental Allergy* 47:339-350
- Lleonart, R., Cistero, A., Carreira, J., Batista, A. y Moscoso del Prado, J. 1992. Food allergy: identification of the major IgE-binding component of peach (*Prunus persica*). *Annals of Allergy* 69:128-30
- Panzani, R., Armentia, A., Lobo, R., Postigo, I., Martínez, J., Arranz, M.L., Martín-Gil, J.F. y Fernández, J.C. 2008. Tolerance mechanisms in response to antigens responsible for baker's asthma in different exposed people. *Journal of Asthma* 45: 333-338
- Quirce, S., Parra, A., Anton, E., Fernández-Nieto, M. y Jerez, J., Sastre, J. 2004. Occupational asthma caused by tali and jatoba wood dusts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113:261-263
- Safi, H., Wangorsch, A., Lidholm, J., Brini, F., Spiric, J., Rihs, H.P., Vieths, S., Armentia, A., Farioli, L., Diaz-Perales, A., Pastorello, E.A. y Scheurer, S. 2019. Identification and molecular characterization of allergenic non-specific lipid-transfer protein from durum wheat (*Triticum turgidum*). *Clinical & Experimental Allergy* 49(1):120-129
- Sastre, J., Fernández-Nieto, M., Rico, P., Martín, S., Barber, D., Cuesta, J., las Heras, M. y Quirce, S. 2003. Specific immunotherapy with a standardized latex extract in allergic workers: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111: 985-94
- Trivedi, V., Apala, D.R. y Iyer, V.N. 2017. Occupational asthma: diagnostic challenges and management dilemmas. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 23:177-183
- Van der Platt, D.A., Vonk, J.M., Terzikhan, N., de Jong, K., de Vries, M., La Bastide-van Gemert, S., van Diemen, C.C., Lahousse, L., Brusselle, *et al.* 2018. Occupational exposure to gases/fumes and mineral dust affect DNA methylation levels of genes regulating expression. *Human Molecular Genetics* 2. pii: ddz067. doi: 10.1093/hmg/ddz067
- Vega, J., Vega, M., Moneo, I., Armentia, A., Caballero, M. y Miranda, A. 2004. Occupational immunologic contact urticaria for pine procesionary carterpillar (*Thaumetapoea pityocampa*). *Contact dermatitis* 50(2): 60-64

## PONIENDO EN CLARO

### Edición genética por CRISPR-Cas y sus aplicaciones en la mejora de los cultivos

Sergio Melero Royo<sup>1,1</sup>, Nicole Martínez-García<sup>1,2</sup> y María Luz Centeno Martín<sup>2</sup>

1. Graduados en Biotecnología (promoción 2015-2019). Facultad de C.C. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 1.1. [smelero0@estudiantes.unileon.es](mailto:smelero0@estudiantes.unileon.es); 1.2. [nmartg05@unileon.es](mailto:nmartg05@unileon.es)
2. Profesora Titular del Departamento de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Área de Fisiología Vegetal, Universidad de León. [mlcenm@unileon.es](mailto:mlcenm@unileon.es)

#### Resumen

En los últimos años se ha desarrollado una tecnología de edición genética potente, barata y relativamente sencilla de usar. Se denomina CRISPR-Cas y se basa en utilizar los componentes de un sistema de inmunidad adaptativa de bacterias para modificar el genoma de un organismo. La metodología permite realizar cortes dirigidos y específicos en la doble cadena de DNA.

Gracias a la aplicación de CRISPR-Cas se han obtenido variedades de cultivo modificadas genéticamente con una eficiencia sin precedentes y que en la mayoría de los casos llegarán al mercado de una forma mucho más rápida que sus predecesores transgénicos. Entre las características incorporadas a estas nuevas variedades se encuentran varias resistencias a estreses bióticos y abióticos, mejoras en la calidad nutricional, o incluso la capacidad para producir moléculas de interés biomédico. La legislación de estos cultivos en diferentes partes del mundo es la principal barrera a la que se enfrenta esta tecnología.

Palabras clave: Mejora vegetal, modificación genética, OGM, transgénesis.

#### Edición genética por CRISPR-Cas

La tecnología CRISPR-Cas ha revolucionado el campo de la edición genética ya que permite realizar modificaciones en los genomas de los seres vivos de forma precisa y más eficiente que las metodologías anteriores. A pesar de su reciente desarrollo, pues sus primeras aplicaciones datan de 2013 (Wang *et al.*, 2013), ya existen ejemplos de su utilización para mejorar la productividad de los cultivos y de los animales de granja, así como para aumentar su resistencia a enfermedades, además de otras aplicaciones que se detallarán posteriormente. La clave de esta revolución reside en las 3 principales características de esta tecnología: es potente, barata y relativamente fácil de usar (Lin *et al.*, 2019).

En este artículo y el siguiente se revisan distintos aspectos metodológicos

Forma de mencionar este artículo: Melero, S., Martínez-García, N., Centeno, M.L. 2019, Edición genética por CRISPR-Cas y sus aplicaciones en la mejora de los cultivos. AmbioCiencias, 17, 14-31. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

de CRISPR-Cas y algunas de sus utilidades, centrándose el primero en las aplicaciones en plantas y el segundo en animales. Los aspectos generales sobre la edición genética y sobre el sistema CRISPR-Cas9, comunes a ambos artículos, se explican a continuación.

¿Qué es la edición genética?

La edición genética es un conjunto de metodologías que permiten introducir cambios en el ADN mediante la generación de roturas de doble cadena (DSB) en las secuencias del genoma que se desea modificar (Fig. 1). En las células, estos DSB se pueden reparar por dos vías (Whitelaw *et al.*, 2016).

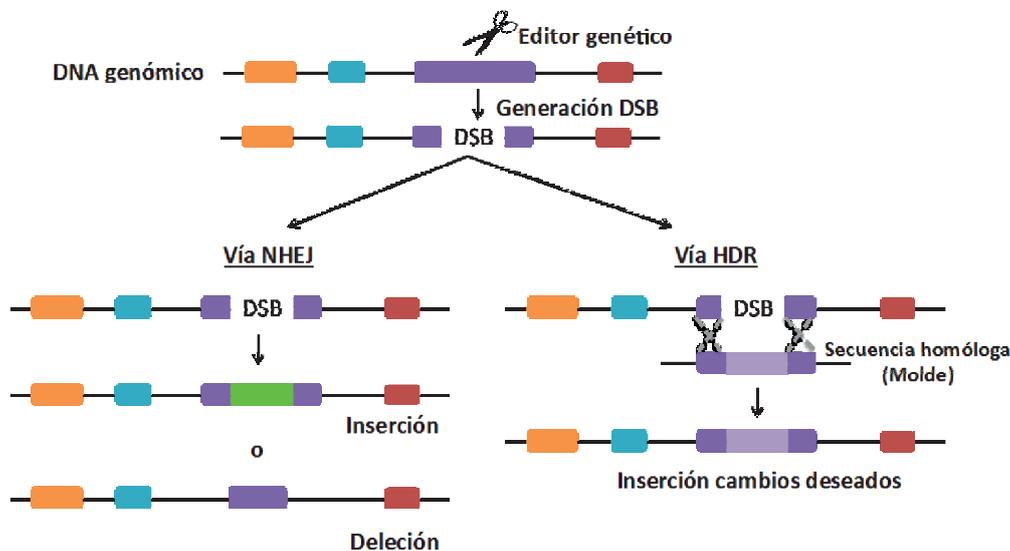


Figura 1. Vías de reparación celular de la rotura de doble cadena (DSB). NHEJ: unión de extremos no homólogos. HDR: reparación homóloga directa.

Hasta en el 90 % de los casos, los DSB son reparados a través del mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ). Esta vía es propensa a errores, lo que con frecuencia determina la introducción de inserciones o deleciones (*indels*) que afectan al marco de lectura del gen (Fig. 1). Por ello, se suele utilizar para inactivar secuencias génicas, generando individuos *knockout* (KO). Por otro lado, si junto con los editores genéticos se aporta una secuencia homóloga, esta puede ser utilizada como molde en la vía de reparación dirigida por homología (*homology directed repair*, HDR). En ese caso, se puede introducir el cambio deseado, incluso secuencias codificantes completas, en el locus diana generando un *knockin* (KI).

Los editores genéticos son complejos enzimáticos con actividad endonucleasa. En la edición genética se han utilizado, cronológicamente, las nucleasas

de dedos de zinc (ZFN), las nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción (TALEN) y el sistema CRISPR-Cas9. Todos los editores tienen dos elementos comunes, uno responsable del reconocimiento de la secuencia diana en el genoma y otro con función endonucleasa para producir el DSB. En el caso de CRISPR-Cas9, el DSB es producido por la nucleasa Cas9, que es “guiada” hasta la secuencia diana previamente reconocida por una molécula de RNA. Esto último hace que su diseño y manejo sea más sencillo y económico que en el caso de las ZFN y las TALEN, donde el reconocimiento se realiza por dominios proteicos (Demirci *et al.*, 2018).

CRISPR-Cas en la naturaleza

En 1987, un grupo de investigadores de la universidad de Osaka observaron en bacterias unas secuencias repetitivas de 29 nucleótidos, situadas al lado del gen que trataban de clonar (Ishino *et al.*, 1987). Años después, el científico español Francisco Mojica logró identificar secuencias de virus insertadas entre estas repeticiones e intuyó que podían formar parte de un sistema de inmunidad bacteriana (Mojica *et al.*, 2005). Él mismo acuñó el acrónimo CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). En 2007, Barrangou *et al.* publicaron el artículo que demostraba que las secuencias CRISPR eran parte de un sistema de inmunidad adaptativa de bacterias frente a fagos, mediado por el locus CRISPR y los genes cas (*CRISPR associated genes*) (Fig. 2), que codifican las proteínas con función endonucleasa.

El locus CRISPR contiene repeticiones (R) palindrómicas cortas de secuencias de DNA bacteriano, agrupadas y regularmente interespaciadas por secuencias variables llamadas espaciadores (E). Estos últimos son secuencias de plásmidos exógenos o de los genomas de virus que han infectado previamente a la célula y que han sido almacenados en el *array* CRISPR (Ahmad *et al.*, 2018). Por otro lado, los genes cas codifican proteínas conservadas (proteínas Cas).



Figura 2. Elementos del sistema CRISPR-Cas, indicándose las repeticiones (R) y los espaciadores (E).

Existen varios tipos de sistemas CRISPR-Cas que se diferencian en la proteína Cas. Los más conocidos son los tipos I, II y III, de los que forman parte Cas3, Cas9 y Cas10, respectivamente (Bhaya *et al.*, 2011). Todos actúan en la defensa frente a DNA exógeno mediante un mecanismo que se desarrolla en tres etapas: (1) detección del DNA foráneo y procesamiento para formar el espaciador, que se

incorpora en el *locus* CRISPR, (2) expresión del *locus* CRISPR ante una nueva amenaza de un virus ya conocido y, (3) reconocimiento por parte de los RNAs sintetizados de la secuencia de DNA diana, que muestra homología con los espaciadores, y actuación de las nucleasas Cas generando un DSB. De acuerdo con esto, podría pensarse que Cas cortaría tanto las secuencias exógenas como su propio locus CRISPR. Sin embargo, esto no sucede porque Cas reconoce un motivo adyacente, la secuencia PAM (*protospacer adjacent motif*) altamente conservada en los genomas virales y que no está presente en el locus CRISPR (Khatodia *et al.*, 2016). Las distintas proteínas Cas reconocen diferentes secuencias PAM.

### CRISPR-Cas en el laboratorio

El sistema CRISPR-Cas más utilizado como herramienta en edición genética es de tipo II y procede de *Streptococcus pyogenes*. En este sistema participan la endonucleasa Cas9 y una pequeña molécula de RNA guía o sgRNA, que dirige a Cas9. El sgRNA se obtiene fusionando los dos RNAs presentes en el sistema natural: crRNA (CRISPR RNA) y tracrRNA (transactivador crRNA) (Fig. 3).

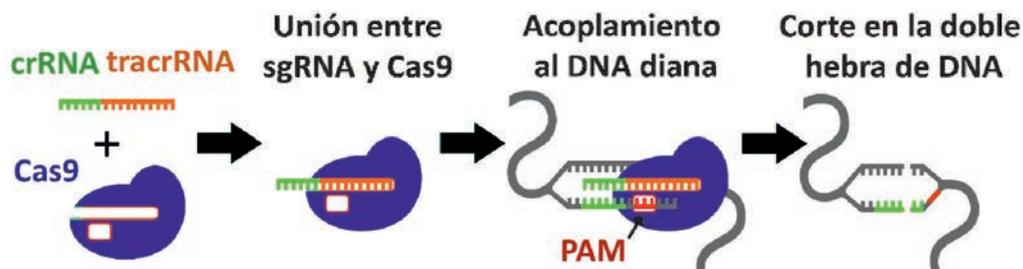


Figura 3. Representación esquemática de un proceso de corte en una secuencia diana mediado por CRISPR-Cas9. Adaptado de Addgene.

A la hora de aplicar el sistema CRISPR-Cas9, en primer lugar hay que definir la secuencia diana y cuál es la modificación que se quiere realizar, para lo que previamente se necesita tener secuenciado y caracterizado el genoma del organismo a modificar (Aglawe *et al.*, 2018). A continuación, y utilizando herramientas bioinformáticas, se buscan los posibles crRNA cercanos a la secuencia PAM reconocible por la Cas9 de *S. pyogenes* (5'-NGG). Además, estos programas analizan posibles repeticiones en otros puntos del genoma para evitar generar cortes indeseados (*off-target*). El crRNA seleccionado se sintetiza y se fusiona con el tracrRNA, dando lugar al sgRNA. Este sgRNA reconoce la secuencia de DNA diana y dirige a la nucleasa a esa región del genoma, donde generará un DSB a 3 pb en dirección 5' de la PAM) (Ishii, 2017) (Fig. 3).

La gran simplicidad de diseño del sgRNA, junto con la disponibilidad comercial de los elementos del sistema determina, entre otros factores, que sea una herramienta cuyo uso se ha difundido amplia y rápidamente.

### CRISPR-Cas y la mejora genética vegetal

La principal aplicación de la edición genética por CRISPR-Cas9 en plantas es sin duda la mejora de los cultivos, una de las principales preocupaciones del hombre a lo largo de la historia. Llevamos modificando las plantas en beneficio propio desde hace unos 15000 años, cuando los primeros agricultores abandonaron la vida nómada y empezaron a seleccionar de forma intuitiva los individuos más productivos de una especie, los protegían, y repetían la selección entre sus descendientes. Tales hechos representaron una fuerte presión selectiva sobre el genoma de las especies (Wieczorek, 2012) y permitieron, entre otros muchos ejemplos, convertir lo que inicialmente era una mala hierba en lo que hoy conocemos como maíz (Fig. 4). Por lo tanto, se podría afirmar que la modificación genética de los cultivos es un proceso inherente a la agricultura, si bien se ha vuelto mucho más sofisticada con los años.

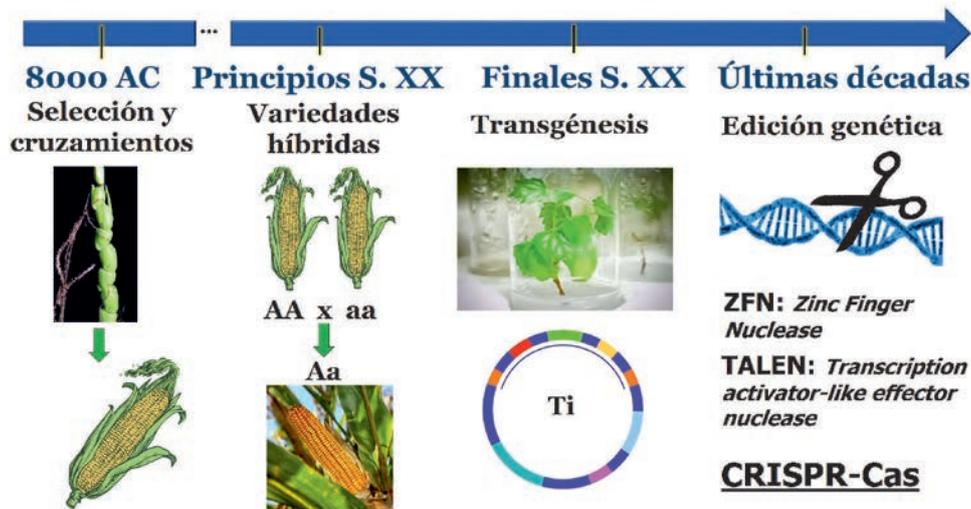


Figura 4. La historia de la mejora genética vegetal en 4 etapas.

El origen de lo que conocemos como mejora genética clásica data de principios del siglo XX, cuando la aplicación de las leyes de la herencia, descritas por Gregor Mendel en el XIX, permitió racionalizar los procesos de cruzamiento sexual entre plantas y selección de los descendientes, así como obtener las primeras líneas homocigóticas. El cruce de dos de estas líneas genera las llamadas variedades híbridas (Fig. 4), formadas por individuos con un genotipo casi idéntico que muestran los caracteres por los que se seleccionaron los parentales. Tales

variedades aportaron a la humanidad una mayor producción agrícola y de alimentos.

El siguiente avance en la mejora de los cultivos consistió en introducir genes provenientes de otras especies en su genoma, lo que se conoce como transgénesis (Fig. 4). Esto solo fue posible gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y de ingeniería genética. La última permitió diseñar los vectores de transformación basados en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, bacteria patógena que ha evolucionado específicamente para introducir secuencias exógenas en el genoma de las plantas, y que resultaron ser muy útiles para realizar modificaciones genéticas en plantas (Vasil, 2008).

*A. tumefaciens* con frecuencia inserta la secuencia de DNA foráneo en zonas transcripcionalmente activas, pero lo hace de forma arbitraria, por lo que no permite editar un punto concreto del genoma. Esta fue la limitación resuelta por la edición genética, pues como ya se ha descrito, la nueva metodología ofrece la posibilidad de modificar puntos específicos de un genoma, inactivando genes por la vía de NHEJ o introduciendo genes nuevos en lugares concretos por la vía de HDR. Con esta vía se obtienen plantas transgénicas al igual que con *A. tumefaciens*, mientras que con la primera se logran variedades genéticamente editadas (GE) pero que no presentan genes exógenos en su genoma. Las variedades GE no transgénicas tienen la gran ventaja de que no deberán verse sometidas a los estrictos y tediosos controles que sí son obligatorios por normativa para los cultivos transgénicos en muchos países.

El empleo de la edición genética en el desarrollo de nuevas variedades, más productivas y resistentes, será clave para resolver el problema de cómo abastecer de alimentos a una población creciente y en un contexto de cambio climático, el cual conlleva un descenso de los recursos y el aumento de estreses bióticos y abióticos a los que se verán sometidos los cultivos (Jaganathan *et al.*, 2018).

### Cómo editar plantas genéticamente usando CRISPR-Cas

En la Fig. 5 se muestran los pasos de un proceso de modificación genética de plantas utilizando la metodología CRISPR-Cas. Tras diseñar y sintetizar los sgRNA adecuados siguiendo las pautas ya explicadas, el segundo paso consiste en elegir el mecanismo de envío del sgRNA y de Cas9 a las células vegetales, por lo general, cultivadas *in vitro*. Para este fin existen dos tipos de estrategias: las DNA-independientes y las DNA-dependientes.

Las estrategias DNA-independientes consisten en introducir en las células de plantas directamente el sgRNA, la nucleasa Cas9 y, en caso de que la edi-

ción se realice por la vía HDR, las sondas de DNA. En principio parece un método sencillo y limpio, dado que al no utilizar vectores de expresión no hay posibilidad de regenerar plantas transgénicas, salvo que ese sea el objetivo (edición HDR). Además, los elementos de CRISPR-Cas9 serán degradados con el tiempo una vez realizada su función y, finalmente, se obtendrá una modificación genética precisa con el menor número de efectos indeseados. El principal problema reside en la pared de las células vegetales, que representa una barrera mecánica que dificulta el envío directo de los complejos sgRNA-Cas9 a su interior. El empleo de protoplastos o células sin pared celular puede ser una solución. Sin embargo, la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos es muy compleja, en especial para especies monocotiledóneas entre las que se incluyen cultivos de gran interés como el maíz, el trigo y la cebada (Liang *et al.*, 2017). Para estos cultivos existe otra estrategia que consiste en bombardear embriones inmaduros con partículas de oro recubiertas de complejos sgRNA-Cas9 – (Svitashev *et al.*, 2016), seguido de la regeneración de embriones somáticos portadores de la edición.

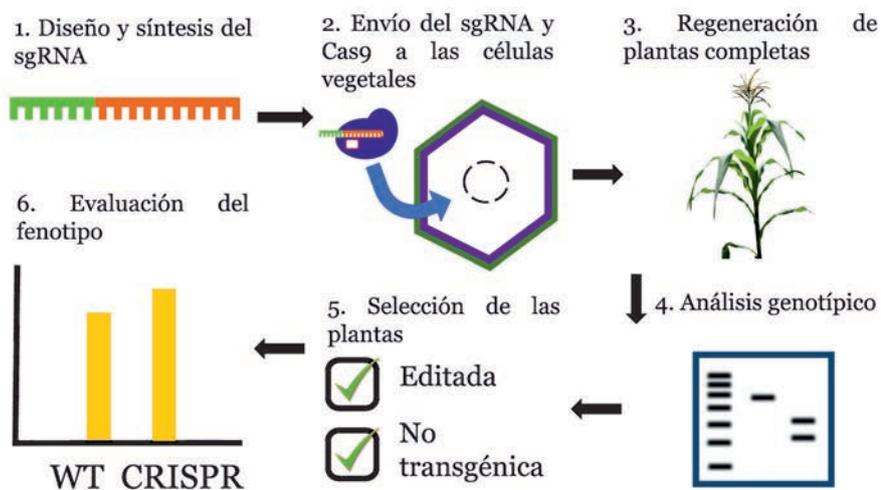


Figura 5. Representación esquemática de un proceso de mejora vegetal usando la edición genética por CRISPR-Cas9.

Aunque los métodos de edición DNA-independientes se han aplicado con éxito en arabisidopsis, tabaco, lechuga, arroz, petunia, trigo, soja, maíz, manzana y uva (Malnoy *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2019), todavía presentan limitaciones para la mayoría de las especies (Veillet *et al.*, 2019). En esos casos se recurre a métodos DNA-dependientes, caracterizados por utilizar vectores de expresión artificiales portadores de secuencias de DNA codificantes de la nucleasa Cas9 y del sgRNA. Una vez que las secuencias se introducen en las células, la idea es que se expresen

para dar lugar a los elementos del sistema de edición que, finalmente, llevan a cabo la modificación en el genoma de la célula. La principal desventaja es la posibilidad de que el DNA foráneo que codifica para los elementos de CRISPR-Cas9 se inserte en el genoma de las células de manera estable, dando lugar a plantas GE y, además, transgénicas, las cuales no interesan en muchos casos por temas de regulación.

Como vehículo de transferencia del DNA exógeno se emplea sobretodo la bacteria *A. tumefaciens* que, se ha utilizado durante mucho tiempo para obtener plantas transgénicas. Generalmente se usan cepas recombinantes portadoras de dos plásmidos (vectores binarios). El primero contiene el DNA de transferencia (T-DNA) con las secuencias que se van a transferir a la célula vegetal, en este caso las que codifican para Cas9 y el sgRNA (Fig. 6). El segundo es un plásmido *helper* que lleva los genes *Vir*, necesarios para que la bacteria realice el procesamiento y el transporte del T-DNA a las células vegetales (Díaz y Chaparro, 2012).

En la práctica ya hay disponibles vectores artificiales en cuyo T-DNA se encuentra la secuencia de Cas9 optimizada con el código genético de la célula diana, un promotor para su expresión y la secuencia de localización nuclear, necesaria para que el complejo Cas9-sgRNA acceda al núcleo de la célula (Sun *et al.*, 2017). Además los vectores cuentan con sitios de restricción únicos en su T-DNA para que el usuario inserte la secuencia del sgRNA diseñado, la cual también contará con un promotor adecuado, por lo general el de la polimerasa III (Aglawe *et al.*, 2018). Tras elaborar y clonar el vector, este se introduce en una cepa de *Agrobacterium* que contiene el plásmido *helper* (Fig. 6). Finalmente, se ponen en contacto la cepa transformada de *Agrobacterium* y las células vegetales en cultivo para que suceda la transferencia del T-DNA (Díaz y Chaparro, 2012).

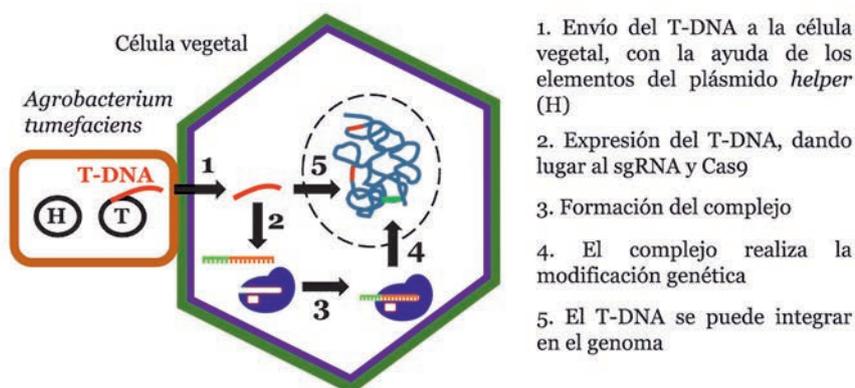


Figura 6. Proceso de edición genética por CRISPR-Cas utilizando el método de transferencia de DNA por *Agrobacterium tumefaciens*.

Una vez que el sistema CRISPR-Cas9 ha realizado la modificación deseada en las células vegetales, el siguiente paso es regenerar plantas GE completas a partir de esas células (paso 3 de la Fig. 5). Para ello existen dos estrategias que proporcionan las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos. La primera es la organogénesis, que consiste en inducir la formación de tallos adventicios y después de raíces en la base de esos tallos. La segunda es la embriogénesis somática, por la cual se desarrollan embriones a partir de las células somáticas modificadas que, posteriormente, germinan dando lugar a las plantas.

Los pasos cuarto y quinto de un proyecto de modificación por edición genética (Fig. 5) son el análisis genotípico de las plantas regeneradas, para comprobar que contienen la mutación de interés, y su selección. Lo más eficaz y preciso para hacer esto es secuenciar el genoma de las plantas, pero también es lo más costoso. Una alternativa consiste en: 1) amplificar la región diana de la mutación por PCR, 2) digerir el amplicón con una enzima de restricción con especificidad por la secuencia original pero que no corte en la modificada y, 3) realizar una electroforesis del DNA digerido (Sun *et al.*, 2017). De este modo es posible distinguir las plantas sin modificar (aparecerán dos bandas en la electroforesis) de las modificadas (se observa una banda resistente al corte). La confirmación de estas últimas como GE se podrá hacer por secuenciación.

Puesto que los métodos más utilizados para editar plantas por CRISPR-Cas9 se basan en estrategias DNA-dependientes que pueden dar lugar a transgénesis, en aquellos casos en los que este no es el objetivo de la edición, los cuales representan la mayoría, hay que asegurarse de que las plantas GE no sean portadoras de transgenes. Para ello, primero se autopolinizan las plantas regeneradas transgénicas y GE ( $G_0$  en la Fig. 7). Su selección es sencilla si en el T-DNA del vector de expresión utilizado en la edición se ha integrado, junto a las secuencias de la nucleasa y del sgRNA, un gen de selección. Este se insertará también en el genoma de las células vegetales, lo que permitirá obtener plantas en un medio de selección (Sun *et al.*, 2017) asegurando que sean transgénicas y aumentando las probabilidades de que tengan la modificación deseada. Una vez generados los descendientes de las plantas  $G_0$  autopolinizadas, y debido a la segregación independiente de los *loci* del transgen y de la edición (Fig. 7), se podrán seleccionar entre ellos los que lleven en su genoma la mutación pero no copias del transgén (Khatodia *et al.*, 2016).

Por último, hay que evaluar el fenotipo en las plantas seleccionadas (paso 6 de la Fig. 5) con un doble objetivo: a) analizar las características que presentan las plantas GE frente a las no modificadas (ganancia) y b) cuantificar el nivel de mejora, por ejemplo, en el rendimiento de la cosecha o en la concentración de algún componente que haga a la variedad más saludable.

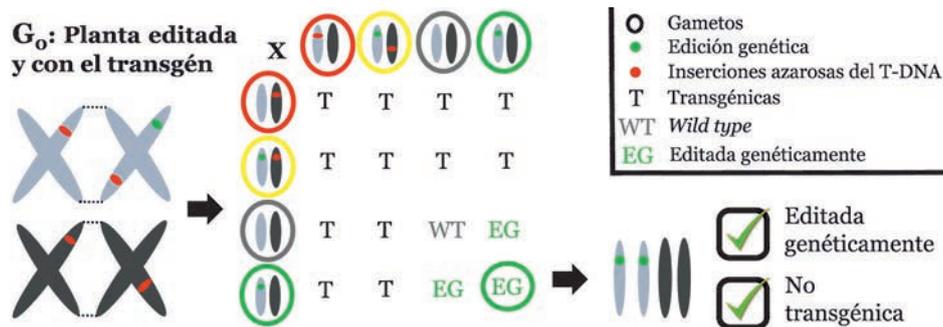


Figura 7. Representación gráfica de la eliminación por segregación de las copias del T-DNA (rojo) y selección positiva de la edición genética (verde). Adaptado de Khatodia *et al.*, (2016).

### Aplicaciones de la edición genética por CRISPR-Cas9 en plantas Generación de cultivos resistentes a estreses abióticos

El desarrollo de las plantas está mucho más fuertemente condicionado por factores ambientales que el de los animales, dado que al ser organismos vegetativos solo tienen la opción de adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes. En la naturaleza, las plantas rara vez crecen en condiciones óptimas y es por esto que, para la mayoría de las especies, el resultado evolutivo de las plantas silvestres no coincide con el genoma ideal que se busca en un cultivar. A día de hoy se han realizado algunos estudios aplicando la edición genética por CRISPR-Cas para obtener cultivos resistentes a estreses abióticos, demostrando así la efectividad del sistema.

Un ejemplo relevante de esta aplicación son las plantas de maíz GE que presentan una productividad mayor que la variedad original en condiciones de sequía, y similar a la mostrada por ellas mismas bajo condiciones normales (Shi *et al.*, 2017). El resultado de la edición genética realizada por los investigadores afecta a la ruta de señalización del etileno, una hormona gaseosa que habitualmente reduce la división y el crecimiento celular en plantas sometidas a estrés abiótico. En estudios previos se había demostrado que plantas transgénicas de maíz, que sintetizaban menos etileno en condiciones de sequía, presentaban menores pérdidas de cosecha que las plantas control (Habben *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta esos resultados, la estrategia planteada por Shi *et al.*, (2017) consistió en sobre-expresar el gen del regulador negativo del etileno *ARGO8*. Esta proteína interfiere con la respuesta a etileno porque interacciona con el receptor de la hormona, inhibiendo así su percepción celular. De esta forma, *ARGO8* permite indirectamente el crecimiento de las plantas en condiciones de sequía. Para lograr la sobre-expresión de *ARGO8*, los autores sustituyeron el promotor nativo del gen por otro más potente e inespecífico de tejido, el del gen *GOS2* del

maíz. Con este fin, aportaron junto con Cas9, dos sgRNAs dirigidos para cortar a ambos lados del promotor nativo y una sonda de DNA correspondiente a la secuencia del promotor *GOS2*, flanqueada por las regiones correspondientes a los lados del promotor nativo. Es decir, intercambiaron un promotor por otro más potente gracias a la vía de HDR. Las plantas GE, además de ser resistentes a sequía, no son transgénicas puesto que la secuencia incluida no es exógena sino que proviene del maíz.

### Generación de cultivos resistentes a estreses bióticos

Las diferentes fuentes de estrés biótico para los cultivos incluyen fitopatógenos (virus, hongos y bacterias causantes de enfermedades), insectos fitófagos e incluso plantas competidoras. Las aplicaciones del sistema CRISPR-Cas para generar líneas resistentes a estreses bióticos son abundantes, especialmente en el caso de los fitopatógenos. De entre ellos, las infecciones virales causan del 10 al 15% de las pérdidas de la producción agrícola total. Una de las principales dianas a la hora de generar plantas GE resistentes a virus es el gen *elf4E* que codifica un factor de transcripción con un papel fundamental para la multiplicación de muchos virus dentro de las células vegetales. Así, existen gran cantidad de trabajos que describen la obtención de plantas *KO* para este gen y que como consecuencia son resistentes a diferentes cepas de virus.

En relación a cultivos GE resistentes a otro tipo de patógenos, un ejemplo son las plantas *KO* para los genes *MLO* (mildew-resistance locus) y resistentes al oídio. La enfermedad está causada por hongos del orden de los Erisiphales, afecta a un espectro muy amplio de cultivos y es fácilmente identificable por la presencia de una capa blanquecina en las hojas de las plantas infectadas. Los genes *MLO* codifican proteínas que hacen susceptibles a las plantas de ser infectadas por el hongo. Por lo tanto, han representado la diana en muchos estudios de edición genética. En uno de ellos (Wang *et al.*, 2014), se obtuvieron plantas de trigo homocigóticas *KO* para 3 alelos del gen *MLO* que contaban con un fenotipo resistente (Fig. 8).

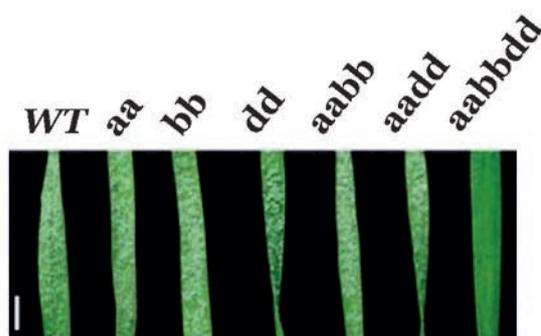


Figura 8. Fenotipos de las plantas infectadas sin modificar (*WT*), *KO* para alguno de los alelos y *KO* para los tres alelos del gen *MLO* (Wang *et al.*, 2014).

### Generación de plantas con calidad nutricional superior

La aplicación de la biotecnología vegetal para obtener plantas de mayor calidad nutricional resulta extremadamente interesante. Por ejemplo, uno de los mayores hitos fue la generación del arroz dorado, una variedad transgénica que sintetiza grandes cantidades de  $\beta$ -caroteno o provitamina A, al contrario que el arroz blanco que es deficiente en este nutriente esencial. El consumo de arroz dorado por parte de grandes poblaciones humanas, localizadas sobretudo en regiones pobres, podría prevenir enfermedades causadas por un aporte insuficiente de  $\beta$ -caroteno.

También se han obtenido variedades de arroz más saludables gracias a la edición genética por CRISPR-Cas, modificando la ruta de síntesis del almidón. Este polisacárido es el principal componente del arroz y se presenta en dos formas moleculares, amilosa y amilopectina. Los almidones son tanto más saludables cuanto mayor sea su proporción de amilosa, debido a que esta constituye una mayor fuente de almidón resistente, el cual ayuda a prevenir infecciones serias y a reducir el índice glucémico. Sin embargo, el porcentaje de amilosa en el almidón del arroz suele ser como máximo del 30%. El equipo de Sun *et al.* (2017) trató de desviar la ruta de síntesis del almidón hacia la amilosa. Para ello realizaron un *KO* del gen *SBEIIb* que juega un papel importante en la síntesis de la amilopectina. Como resultado obtuvieron plantas GE con una proporción de amilosa un 10% superior (Fig. 9).

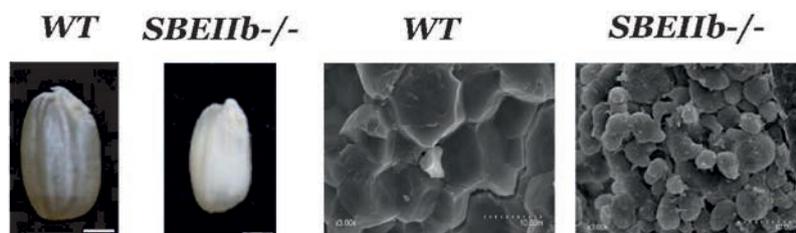


Figura 9. Fenotipo de los granos de arroz y del almidón en estos, provenientes de plantas sin modificar (*WT*) y *KO* para el gen *SBEIIb*. Adaptado de Sun *et al.* (2017).

### Otras aplicaciones

Además de las aplicaciones de la edición por CRIPR-Cas9 para mejorar los cultivos que ya se han descrito en este apartado, existen otras muy diversas. Una de ellas es la obtención de plantas biofactoría, es decir, plantas capaces de “fabricar” proteínas recombinantes de interés comercial (*molecular farming*), entre las que se encuentran los anticuerpos. Sin embargo, su producción en planta tiene un problema y es que, al tratarse de glicoproteínas, se incorporan residuos azúcar que son característicos de plantas y no de animales, como la

$\beta(1,2)$ -xilosa o la  $\alpha(1,3)$ -fucosa. Tales residuos pueden interferir con la actividad del anticuerpo recombinante o causar reacciones inmunológicas indeseadas. Por esta razón, Mercx *et al.* (2017) se propusieron generar plantas de tabaco *KO* para los genes *XylT* y *FucT*, que codifican las enzimas responsables de las glicosilaciones mencionadas. Las plantas GE resultantes, *KO* para 12 alelos en total, se transformaron con los genes de un anticuerpo que lograron sintetizar sin que contuviera xilosa ni fucosa.

Por último, la edición por CRIPR-Cas9 también permite acelerar los procesos de domesticación de plantas. Así lo demostró el equipo de Zsögön *et al.* (2018), que logró domesticar una variedad silvestre de tomate en un solo ensayo mediante el *KO* de 6 genes (Fig. 10). Las plantas GE produjeron 10 veces más tomates que las no modificadas y los frutos tuvieron un tamaño superior y una calidad nutricional mejorada, pues acumularon 5 veces más licopeno. Este tipo de aplicaciones pueden ayudar a preservar la diversidad genética natural (biodiversidad) de las especies, que representa la base de todo proceso de mejora y cuya pérdida con el paso del tiempo es uno de los problemas de la agricultura moderna.

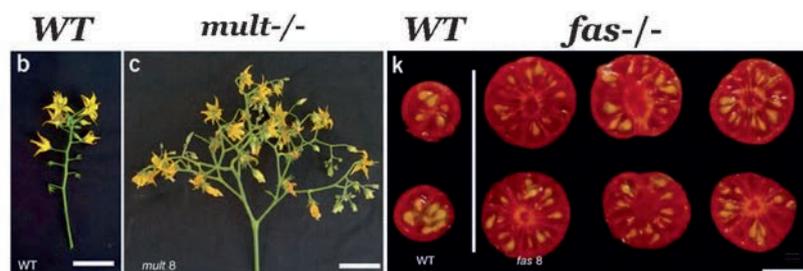


Figura 10. Fenotipo de las inflorescencias y frutos en tomates silvestres (*WT*) y *KO* para *mult* y *fas*. Adaptado de Zsögön *et al.* (2018).

### Regulación de los cultivos editados genéticamente

Como ya se mencionó, la tecnología CRISPR-Cas9 se puede aplicar para generar plantas en las que se incorpora de forma estable una secuencia de DNA exógena, al igual que sucede en los cultivos transgénicos obtenidos mediante transformación. Pero la edición genética también puede dar lugar a plantas no transgénicas, con modificaciones similares a las mutaciones espontáneas o a las producidas por agentes mutagénicos y que, por lo tanto, no pueden ser distinguidas de las plantas obtenidas por métodos de mejora tradicionales. Basándose en esta información, sería lógico que las variedades GE no transgénicas fueran sometidas a una regulación distinta y menos restrictiva que los cultivos transgénicos. Esta es la visión adoptada por la mayor parte de los países a

excepción de los ubicados en la Unión Europea (UE).

La decisión que acontece a la regulación de los nuevos cultivos GE no transgénicos en Europa fue tomada por el Tribunal de Justicia de la UE en 2018. Se concluyó que los estados miembros los regularían de la misma forma que los cultivos biotecnológicos ya existentes. En otras palabras, prácticamente se prohibió su cultivo y comercialización, dado que la mayor parte de los países miembros tiene prohibido el cultivo de transgénicos (Holman, 2019). La decisión es una mala noticia por numerosas razones. Por ejemplo, afectará de manera negativa al continente africano, de donde Europa importa la mayor parte de los productos agrícolas, y donde se están desarrollando variedades GE por CRISPR-Cas (Gomez *et al.*, 2019).

Sin embargo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) establece que no se tratarán como organismos transgénicos aquellos que hubieran podido obtenerse igualmente por métodos de mejora tradicionales (Tabla 1). Esto incluye: deleciones, sustituciones de unos pocos pares de bases, inserciones de secuencias provenientes de plantas compatibles para la reproducción, o descendencia que no contenga el transgén gracias a la segregación (Ramaiah, 2018). Por otro lado, el sistema de regulación canadiense se basa en evaluar el producto final y no la tecnología a través de la cual se ha generado el cultivo, esto favorece a las plantas GE. Japón, que siempre ha sido un país reactivo a los cultivos biotecnológicos, no ha seguido el camino de Europa y ha estipulado que los cultivos GE que no contengan secuencias exógenas no deberían ser sometidos al protocolo de Cartagena, es decir, no deberían ser tratados como transgénicos. Otros países de acuerdo con no evaluar a los cultivos GE de la misma forma que a los transgénicos incluyen: Australia, Brasil, Guatemala, Colombia, República Dominicana, Honduras, Jordania, Paraguay, Uruguay, Chile, Argentina, Vietnam y la Comunidad Económica de Estados de África Occidental (Ramaiah, 2018; Holman, 2019).

La tecnología CRISPR-Cas ya ha demostrado su potencial con una velocidad sin precedentes (Tabla 1). Por desgracia, la política regulatoria supone el principal obstáculo en algunos países. La divulgación científica que explique, de forma transparente y objetiva, en qué consiste la técnica y cuáles son sus aplicaciones y beneficios, será una herramienta esencial para ganarse la confianza del público.

Tabla 1. Listado de cultivos modificados genéticamente por CRISPR-Cas que el USDA no regulará bajo el artículo 7CFR parte 340. I.P: Información protegida (USDA, 2019).

Fecha	Institución	Variedad de cultivo modificado
31/7/2019	Altria Client Services LLC	Línea de tabaco (I.P).
17/6/2019	University of Minnesota	Soja con cambios en la longitud del peciolo.
17/06/2019	University of Minnesota	Soja con composición de la semilla alterada.
19/4/2019	Illinois State University	<i>Thlaspi arvense</i> (I.P).
27/9/2018	Yield10 Bioscience	Línea de camelina (I.P).
6/8/2018	Illinois State University	<i>Thlaspi arvense</i> (I.P).
12/7/2018	Iowa State University	Maíz (I.P).
14/5/2018	University of Florida	Tomate <i>KO</i> para el gen <i>JOINTLESS2</i> .
16/1/2018	DuPont Pioneer	Maíz resistente a la enfermedad causada por el hongo <i>Setosphaeria turcica</i> . Reemplazo del alelo del gen <i>NLB18</i> .
16/10/2017	USDA ARS	Soja resistente a sequía y salinidad. <i>KO</i> para los genes <i>Drb2a</i> y <i>Drb2b</i> .
29/8/2017	Yield10 Bioscience	Camelina con mayor contenido en aceite.
7/4/2017	Donald Danforth Plant Science Center	<i>Setaria viridis</i> con florecimiento retardado. <i>KO</i> del gen homólogo a <i>ID1</i> en <i>Zea mays</i> .
18/4/2016	DuPont Pioneer	Maíz Waxy con contenido prácticamente exclusivo de amilopectina en el almidón. <i>KO</i> para el gen <i>Wx1</i> .
13/4/2016	Pennsylvania State University	Champiñón común <i>KO</i> para el gen de la polifenol oxidasa.

## Bibliografía

- Aglawe, S. B., Barbadikar, K. M., Mangrauthia, S. K. y Madhav y M. S. 2018. New breeding technique «genome editing» for crop improvement: applications, potentials and challenges *3 Biotech* 8(8):336-356
- Ahmad, H. I., Ahmad, M. J., Asif, A. R., Adnan, M., Iqbal, M. K., Mehmood, K., Muhammad, S. A., Bhuiyan, A. A., Elokil, A., Du, X., Zhao, C., Liu, X. y Xie, S. 2018. A review of crispr-based genome editing: Survival, evolution and challenges. *Current Issues in Molecular Biology*:47-68
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. y Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science* 315(5819):1709-1712
- Bhaya, D., Davison, M. y Barrangou, R. 2011. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics* 45:273-97
- Demirci, Y., Zhang, B. y Unver, T. 2018. CRISPR/Cas9: An RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. *Journal of cellular physiology* 233(3):1844-1859
- Díaz, C. y Chaparro, A. 2012. Métodos de transformación genética en plantas, *U.D.C.A Actualidad & divulgación científica* 15(1):49-61
- Gomez, M. A., Lin, Z. D., Moll, T., Chauhan, R. D., Hayden, L., Renninger, K., Beyene, G., Taylor, N. J., Carrington, J. C., Staskawicz, B. J. y Bart, R. S. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence, *Plant biotechnology journal* 17(2):421-434
- Habben, J. E., Bao, X., Bate, N. J., DeBruin, J. L., Dolan, D., Hasegawa, D., Helentjaris, T. G., Lafitte, R. H., Lovan, N., Mo, H., Reimann, K. y Schussler, J. R. 2015. Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions, *Plant biotechnology journal* 12(6):685-693
- Holman, C. M. 2019. A fractured international response to CRISPR-enabled gene editing of agricultural products, *Biotechnology law report* 38(1):3-23
- Ishii, T. 2017. Genome-edited livestock: Ethics and social acceptance, *Animal Frontiers* 7(2):24-32.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. y Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *Journal of bacteriology* 169(12):5429-33
- Jaganathan, D., Ramasamy, K., Sellamuthu, G., Jayabalan, S. y Venkataraman, G. 2018. CRISPR for crop improvement: an update review, *Frontiers in plant science*, 9(985):1-17.
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P. y Tuteja, N. (2016) The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops, *Frontiers in plant science*, 7(506):1-13.
- Liang, Z., Chen, K. y Gao, C. 2019. Biolistic delivery of CRISPR/Cas9 with ribonucleoprotein complex in wheat, *Methods in molecular biology*

- 1927(24):327-335
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., Liu, J., Zhang, H., Liu, C., Ran, Y. y Gao, C. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Nature communications* 8(14261):1-5
- Lin, H., Deng, Q., Li, L. y Shi, L. 2019. Application and Development of CRISPR/Cas9 Technology in Pig Research, en *Gene Editing - Technologies and Applications*.
- Malnoy, M., Viola, R., Jung, M.-H., Koo, O.-J., Kim, S., Kim, J.-S., Velasco, R. y Nagamangala Kanchiswamy, C. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins, *Frontiers in plant science* 7(1904):1-9
- Mercx, S., Smargiasso, N., Chaumont, F., De Pauw, E., Boutry, M. y Navarre, C. 2017. Inactivation of the  $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the  $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 Cells by a Multiplex CRISPR/Cas9 Strategy Results in Glycoproteins without Plant-Specific Glycans, *Frontiers in plant science* 8(403):1-11
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. y Soria, E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, *Journal of molecular evolution* 60(2):174-182
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M., Hakimi, S. M., Mo, H. y Habben, J. E. 2017. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions, *Plant biotechnology journal* 15(2):207-216
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., Du, W., Du, J., Francis, F., Zhao, Y. y Xia, L. 2017. Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes, *Frontiers in Plant Science* 8:298
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J. K. y Mark Cigan, A. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Nature communications* 7(13274):1-7
- Vasil, I. K. 2008. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops, *Plant cell reports* 27(9):1423-1440
- Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M.-P., Guyon-Debast, A., Chauvin, J.-E., Nogué, F. y Mazier, M. 2019. Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using *Agrobacterium*-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor, *International journal of molecular sciences* 20(2):402
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F. y Jaenisch, R. 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering, *Cell* 153(4):910-918
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C. y Qiu, J.-L. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew, *Nature biotechnology* 32(9), pp. 947-951
- Whitelaw, C. B. A., Sheets, T. P., Lillico, S. G. y Telugu, B. P. 2016. Engineering large animal models of human disease, *The Journal of Pathology* 238(2):247-56
- Wieczorek, W. 2012. History of agricultural biotechnology: how crop development has evolved, *Nature Education Knowledge* 3(10):1-9

- Zsögön, A., Čermák, T., Naves, E. R., Notini, M. M., Edel, K. H., Weigl, S., Freschi, L., Voytas, D. F., Kudla, J. y Peres, L. E. P. 2018. *De novo* domestication of wild tomato using genome editing, *Nature Biotechnology*, 36(12):1211-1216
- Addgene. 2019. <https://www.addgene.org/crispr/guide> (Acceso 2/19/2019)
- Ramaiah, V. 2018. <http://ilsirf.org/wp-content/uploads/sites/5/2018/09/4.-SABC2018-Valas-Presentation-17Sept2018-F.pdf> (Acceso 23/03/2019)
- USDA. 2019. [https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/am-i-regulated/regulated\\_article\\_letters\\_of\\_inquiry/regulated\\_article\\_letters\\_of\\_inquiry](https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/biotechnology/am-i-regulated/regulated_article_letters_of_inquiry/regulated_article_letters_of_inquiry) (Acceso 7/11/2019).

## Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9 a la modificación genética en animales domésticos

Nicole Martínez-García<sup>1,1</sup>, Sergio Melero Royo<sup>1,2</sup>, Margarita M. Marqués<sup>2,3</sup>, Yolanda Bayón<sup>2</sup>

1. Graduados en Biotecnología (promoción 2015-2019). Facultad de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 1.1. [nmarto5@estudiantes.unileon.es](mailto:nmarto5@estudiantes.unileon.es); 1.2. [smeleroo@estudiantes.unileon.es](mailto:smeleroo@estudiantes.unileon.es)
2. Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León.
3. Instituto de Desarrollo Ganadero y Sanidad Animal (INDEGSAL), Campus de Vegazana s/n, 24071 León.

### Resumen

Los editores genéticos, especialmente el sistema CRISPR-Cas9, han supuesto un gran avance para la modificación genética de animales. En el presente artículo, se realiza una revisión de la metodología específica en animales domésticos y sus aplicaciones en Producción Animal y Biomedicina. La parte general sobre la edición genética y el sistema CRISPR-Cas9, ha sido desarrollada en el artículo anterior centrado en las plantas. A pesar de su reciente implementación en la década actual, esta herramienta ha demostrado ya su eficacia en aspectos tan diversos como la resistencia a enfermedades, la mejora de productos de origen animal, o también el uso de animales como biorreactores, modelos de enfermedades humanas o fuente de órganos para xenotrasplante. A pesar de aspectos técnicos que aún deben ser abordados, el sistema CRISPR-Cas9 con su elevada eficiencia y diseño rápido, sencillo y económico, destaca entre las técnicas de modificación genética. Esto lo convierte, en este contexto, en la metodología con mejores perspectivas futuras, no solo para el mundo animal sino también en el ámbito de la salud humana.

Palabras clave: CRISPR, Edición genética, Producción Animal, Biomedicina.

### Relevancia de la edición genética

La modificación genética de los animales de granja para mejorar la salud y el bienestar de los animales y optimizar la producción de alimentos, así como su utilización en Biomedicina ha sido un objetivo durante décadas. Aunque ya se habían logrado resultados relevantes, ha sido el desarrollo de la edición genética y, en concreto del sistema CRISPR-Cas9, lo que ha permitido incrementar la eficiencia para realizar cambios muy precisos en el genoma y ampliar el ámbito de las aplicaciones posibles (Tait-Burkard *et al.*, 2018). En el contexto de la Biomedicina, en comparación con los roedores de laboratorio, los animales domésticos pueden llegar a ser mejores modelos preclínicos y clínicos para el estudio de

Forma de mencionar este artículo: Martínez-García, N., Melero, S., Marqués, M.M., Bayón, Y. 2019, Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9 a la modificación genética en animales domésticos. *AmbioCiencias*, 17, 32-45. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

muchas enfermedades humanas. Además, tienen el potencial de proporcionar productos de alto interés, desde proteínas recombinantes hasta órganos para xenotrasplante. Por otro lado, la edición genética en el ganado también puede contribuir a mejorar la Producción y Sanidad Animal. Se puede incrementar la cantidad y/o calidad de los productos de origen animal, así como conferir resistencia a enfermedades, favoreciendo la adaptación al medio ambiente. Por lo tanto, esta tecnología se ha convertido en una herramienta esencial para la modificación genética en animales. Finalmente, la edición genética permite realizar estudios de genómica funcional ya que, al inactivar genes de función desconocida, esta se puede identificar observando el fenotipo de los animales editados genéticamente.

### Metodología CRISPR-Cas9 en animales domésticos

Como se ha indicado anteriormente, la parte general sobre edición genética y CRISPR-Cas9, así como sus aplicaciones en plantas, han sido desarrolladas en el artículo anterior publicado en este mismo volumen. El sistema CRISPR-Cas9 ha demostrado también una elevada eficacia en células animales en cultivo por lo que, en la actualidad, es el método de elección para la transgénesis en animales de granja en combinación con la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). Esta técnica consiste en la reconstrucción de un embrión mediante la transferencia, a ovocitos enucleados, de células somáticas que sirven como donadoras del núcleo. Estas células pueden haber sido transfectadas con los elementos del sistema CRISPR-Cas9 y, posteriormente, analizadas para se-

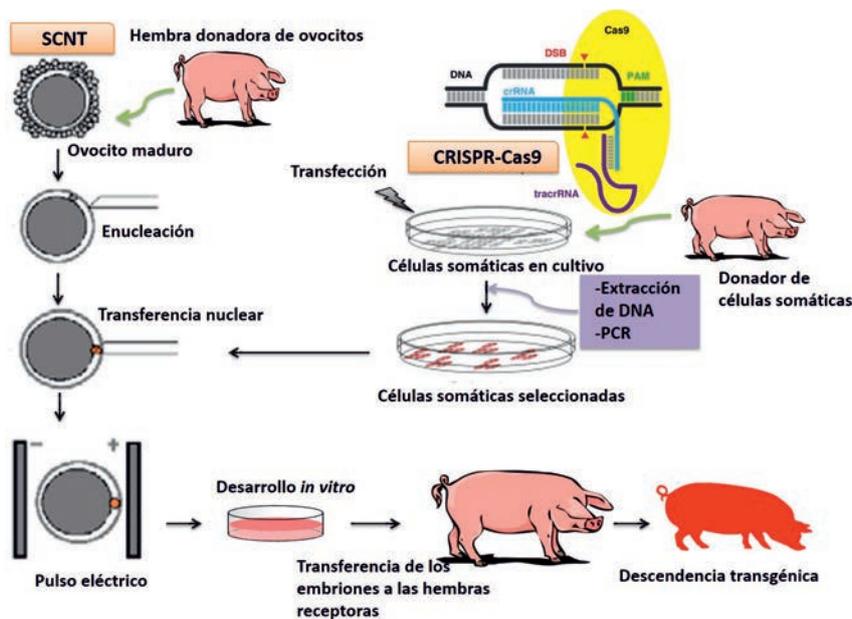


Figura 1. Etapas para la edición genética en animales domésticos mediante CRISPR-Cas9.

leccionar las editadas correctamente (Whitelaw *et al.*, 2015). Los embriones resultantes son transferidos a una hembra receptora en estado de pseudogestación y, tras la gestación, se obtendrán crías con la misma modificación genética que la célula somática que se utilizó como “donante” (Fig. 1).

También se ha conseguido simplificar la obtención de los animales transgénicos realizando la modificación directa de cigotos mediante microinyección (Fig. 2A), o incluso, sometiendo a una mezcla de cigotos y el sistema CRISPR-Cas9 a un pulso eléctrico (electroporación) (Fig. 2B).

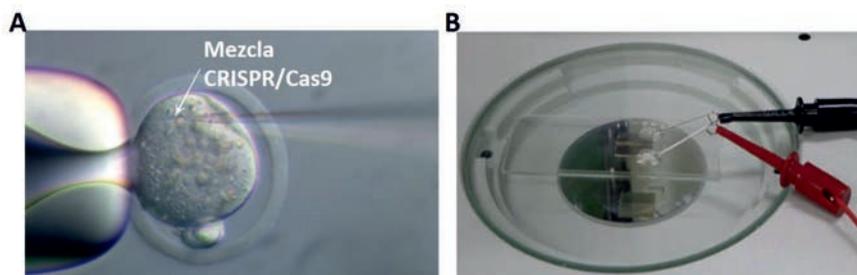


Figura 2. A) Microinyección (Doe *et al.*, 2018). B) Electroporación (Hashimoto y Takemoto 2015).

A continuación, se revisan las investigaciones que se han llevado a cabo en animales domésticos diferenciando, por un lado, el campo de la Producción Animal y, por otra parte, la Biomedicina.

### Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9 en Producción Animal

El sistema CRISPR-Cas9 ha demostrado su eficiencia en diversas aplicaciones en el ámbito general de la Producción Animal (Fig. 3).

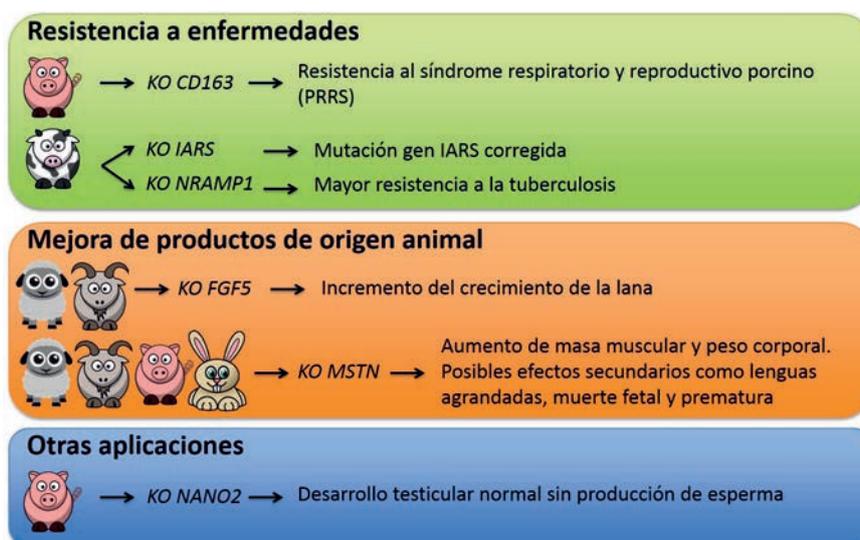


Figura 3. Aplicaciones en Producción Animal del sistema CRISPR-Cas9 en animales domésticos. Se indica si se ha llevado a cabo la inserción (*KI* o *knockin*) o inactivación (*KO* o *knockout*) de un determinado gen y los resultados observados.

### Resistencia a enfermedades

Incrementar la resistencia tanto a enfermedades genéticas como infecciosas supone mejorar la productividad de las explotaciones así como la calidad de vida de los animales y, en ciertos casos, reducir la probabilidad de transmisión de enfermedades al ser humano. En este contexto es de destacar, por ser una de las investigaciones recientes más relevante, la generación de cerdos resistentes al síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), una enfermedad altamente contagiosa de distribución mundial. Los efectos más devastadores se observan en lechones jóvenes y cerdas gestantes (abortos) y es una de las enfermedades que produce mayores pérdidas económicas a los productores de ganado por-ino (Whitworth y Prather, 2017). El agente causal de la enfermedad es el virus del PRRS (PRRSV), con dos tipos genéticamente diferentes: PRRSV-1 y PRRSV-2, predominantes en Europa y América, respectivamente.

Basándose en el hecho ya conocido de que el dominio 5 del receptor CD163 es esencial para la unión del virus, Burkard *et al.* (2017, 2018) generaron, mediante CRISPR-Cas9, cerdos *knockout* para dicho dominio. Este es uno de los dominios ricos en cisteína (SRCR) de la región extracelular del receptor CD163. Para ello microinyectaron en el citoplasma de cigotos una combinación del RNAm de Cas9 y dos sgRNA que flanqueaban al exón 7 codificante del dominio 5, provocando la eliminación del exón. La transferencia de los blastocistos a cerdas receptoras generó parte de los lechones con la delección del exón 7. Finalmente, mediante cruzamientos se obtuvieron lechones heterocigotos y homocigotos ( $\Delta$ SRCR5) (Fig. 4A).

Los ensayos *in vitro* demostraron resistencia de las células  $\Delta$ SRCR5 a la infección por PRRSV-1 y PRRSV-2. Por su parte, los ensayos *in vivo* de desafío con PRRSV-1, permitieron comprobar la resistencia de los animales  $\Delta$ SRCR5 a la infección. Así, tras la administración intranasal del virus, se observaron signos clínicos de la enfermedad exclusivamente en los lechones *wildtype* (WT). Además, una prueba ELISA detectó la presencia de anticuerpos contra el virus en lechones WT pero no en  $\Delta$ SRCR5 (Fig. 4B). Igualmente, la necropsia evidenció lesiones en pulmones de los animales WT mientras que no se observaron en los  $\Delta$ SRCR5 (Fig. 4C). Un aspecto a destacar es que, en todos los casos, se mantenían las funciones biológicas de la proteína CD163. La generación de estos animales ofrece una gran oportunidad para la industria porcina, permitiendo una mejora tanto en la productividad de las explotaciones como en el bienestar animal.

Además de este ejemplo, también se han obtenido vacas con mayor resistencia a la tuberculosis, una zoonosis de elevado coste económico en el ganado

bovino asociado a la eliminación de animales en la granja y restricciones de movimientos pecuarios. En los animales editados genéticamente, se redujo la multiplicación de la bacteria causante de la enfermedad, *Mycobacterium bovis*, insertando copias adicionales de genes endógenos asociados con la inmunidad innata, como el gen NRAMP1 (Fig. 5A) (Gao *et al.*, 2017). También se ha logrado corregir enfermedades genéticas tales como el síndrome de isoleucil-tRNA sintetasa (IARS), frecuente en el ganado bovino negro japonés, causado por la sustitución de un solo nucleótido. La reparación se ha conseguido incorporando la secuencia correcta mediante el sistema CRISPR-Cas9 (Ikeda *et al.*, 2017).

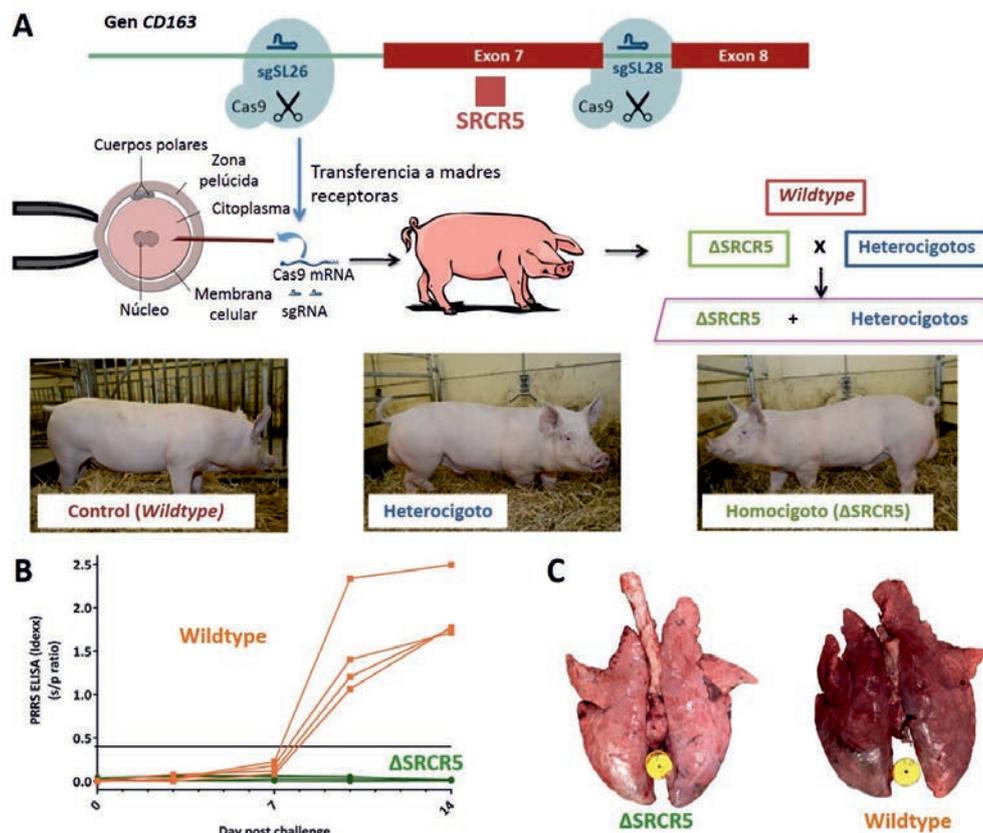


Figura 4. A) Proceso de edición genética para la generación de cerdos  $\Delta$ SRCR5. B) Detección de anticuerpos frente a PRRSV-1 y C) Necropsia pulmonar en lechones WT y  $\Delta$ SRCR5. Burkard *et al.* (2017, 2018).

### Mejora de productos de origen animal

En este grupo de aplicaciones, el gen más estudiado es *MSTN*, codificante de la proteína miostatina, que interviene en el control del crecimiento muscular en los mamíferos. Se conocen mutaciones naturales en algunas especies animales que inactivan la proteína o reducen su expresión causando un aumento de la musculatura, como se ha encontrado en algunos casos en el ganado bovino y ovi-

no e incluso en el ser humano. El fenotipo resultante se conoce como *double-muscling* o hipertrofia muscular. Sobre esta base y utilizando el sistema CRISPR-Cas9 se han generado animales *KO* para este gen en diversas especies (Fig. 3) tales como cabras, conejos, ovejas y cerdos (Tanihara *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019) (Fig. 5B). Se han conseguido así diferentes niveles de incremento de la masa muscular y peso corporal aunque, en alguna ocasión, se han encontrado efectos secundarios negativos.

Otro de los productos de origen animal cuyas características se ha intentado mejorar es la lana. Uno de sus rasgos de calidad es la longitud, que está controlada por el factor de crecimiento fibroblástico 5 (FGF5), inhibidor dominante de la duración del ciclo capilar. Se ha observado el fenotipo de pelo largo de forma natural en algunas especies como perros y gatos debido a una mutación en el gen *FGF5*. En base a esto, con el objetivo de aumentar la longitud de la lana, se ha utilizado el sistema CRISPR-Cas9 para generar tanto ovejas como cabras *KO FGF5*, obteniéndose un incremento del crecimiento de la lana y del número de folículos pilosos (Fig. 5C).

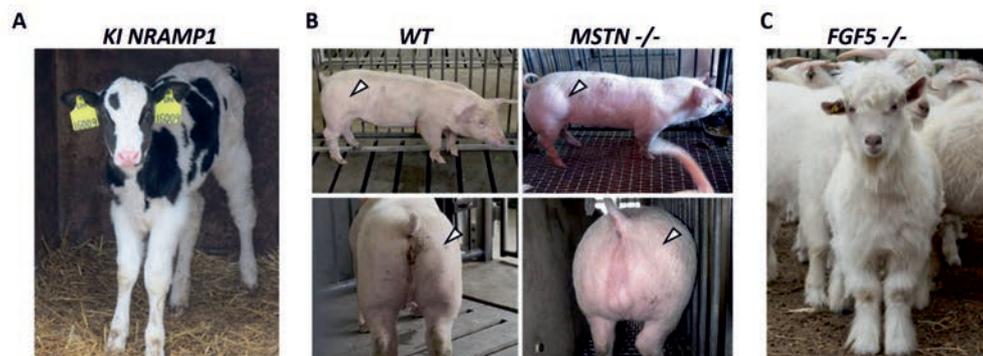


Figura 5. A) Vacas con mayor resistencia a la tuberculosis (Gao *et al.*, 2017). B) Masa muscular aumentada en cerdos *KO* en comparación con *WT* (Tanihara *et al.*, 2016). C) Cabras con incremento de la longitud de la lana (Wang *et al.*, 2016a).

### Otras aplicaciones

Los métodos de mejora genética tradicional, mediante selección y cruce implican resultados a largo plazo y un alto coste. Una de las posibles aplicaciones más singulares de la utilización del sistema CRISPR-Cas9, es la generación de animales estériles que pueden utilizarse como receptores para el trasplante de espermatogonias de sementales genéticamente deseables (Lin *et al.*, 2019). En este sentido, ya se han logrado los primeros resultados mediante la inactivación de genes importantes para el desarrollo de células germinales, como el caso de cerdos *KO* para el gen *NANO2* (Park *et al.*, 2017), que presentan el fenotipo de ablación de la línea germinal masculina en individuos homocigotos,

pero con otros aspectos del desarrollo testicular normales. Estos animales se usarían para distribuir germoplasma en la población.

### Aplicaciones del sistema CRISPR-Cas9 en Biomedicina

Mediante este sistema se han conseguido avances en la obtención de animales modificados genéticamente para diferentes aplicaciones Biomédicas (Fig. 6).

#### Modelos de enfermedad

La disponibilidad de animales modelo de una enfermedad humana constituye una herramienta muy valiosa para investigar el proceso patológico y desarrollar tratamientos adecuados. En muchos casos, en los que no se dispone de un modelo natural, la modificación genética hace posible generar dichos modelos. Aunque depende del tipo de enfermedad, el cerdo es el animal considerado frecuentemente como más idóneo dada su similitud con la especie humana en aspectos como el tamaño de sus órganos y su fisiología. Mediante el sistema CRISPR-Cas9 se han conseguido ya cerdos modelo para distintas enfermedades y síndromes humanos (Fig. 6), como por ejemplo la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, caracterizada por la mutación en el gen *NPC1L1*, o los síndromes de Waardenburg y Tietza causados por mutaciones en el gen *MITF* y que provocan hipopigmentación y sordera (Zhou *et al.*, 2016).

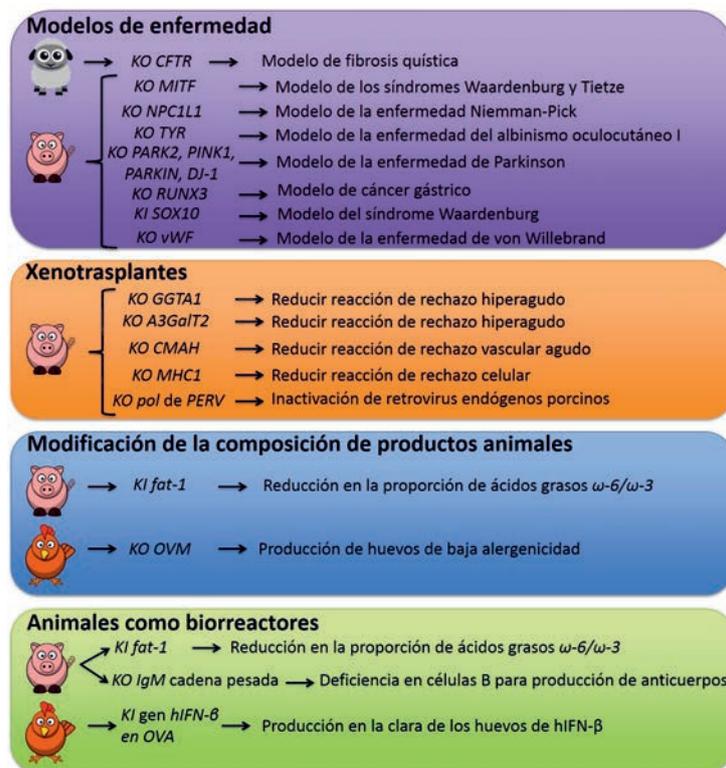


Figura 6. Aplicaciones en Biomedicina del sistema CRISPR-Cas9 en animales domésticos. Se indica si se ha llevado a cabo la inserción (*KI*) o inactivación (*KO*) de un determinado gen y los resultados observados.

También se han generado cerdos modelo para el albinismo oculocutáneo tipo 1, la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Von Willebrand. El albinismo oculocutáneo tipo 1 está causado por mutaciones en el gen *TYR*, que codifica la proteína tirosinasa responsable de la producción de melanina. Al obtener cerdos *KO TYR* (Zhou *et al.*, 2014), se observó que habían perdido el pigmento de la piel, cabello y ojos (Fig. 7A), al igual que ocurre en humanos. En la enfermedad de Parkinson se han identificado mutaciones en más de 10 genes, entre ellos *PARK2*, *PINK1*, *DJ-1* y *parkin*. En este caso, se han generado cerdos doble y triple *KO* y se está investigando su utilidad como modelos de la enfermedad (Wang *et al.*, 2016b). La enfermedad de Von Willebrand está causada por el déficit del gen *vWF*. En este caso, para obtener el modelo en cerdos se dirigió el sgRNA al exón 5 del gen, observándose que los *KO* obtenidos padecían de hemorragia severa como ocurre en humanos.

Otra de las patologías que ha concentrado un gran número de investigaciones es la fibrosis quística, una enfermedad genética grave que cursa, entre otros síntomas, con alteraciones pulmonares progresivas que provocan la muerte. Está causada por la mutación en el gen *CFTR* que codifica una proteína encargada de regular el transporte activo de iones de cloro hacia el exterior de la membrana, y cuya alteración causa el acúmulo de una sustancia mucosa en los diferentes conductos del organismo. Aunque se habían obtenido cerdos modelo de esta enfermedad antes del desarrollo de la edición genética, mediante el sistema CRISPR-Cas9 se han generado recientemente ovejas *KO* (Fan *et al.*, 2018) que, debido a su similitud en la anatomía y desarrollo pulmonar con la especie humana, desarrollaron una enfermedad similar a la patología en humanos (Fig. 7B).

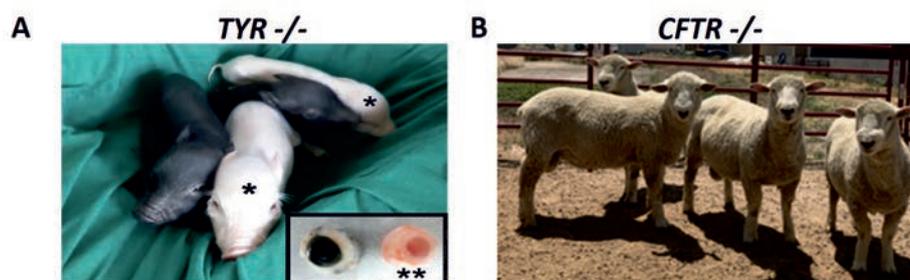


Figura 7. A) Pelaje\* y ojos\*\* de cerdos modelo del albinismo oculocutáneo tipo 1 (Zhou *et al.*, 2014). B) Ovejas modelo de fibrosis quística (Fan *et al.*, 2018).

### Xenotrasplantes

La dramática escasez de órganos humanos para trasplante hace necesarias otras alternativas, entre ellas la utilización de tejidos y órganos de otras especies en las que se haya reducido la posible reacción de rechazo inmunológico

mediante modificación genética. Al igual que ocurre con los animales modelos de enfermedad, el cerdo es considerado la mejor opción, por sus semejanzas con los humanos y su escasa probabilidad de transmisión de patógenos en comparación con los primates. Con este fin, se han llevado a cabo numerosas investigaciones, muchas de ellas previas a la utilización de la edición genética. Mediante el sistema CRISPR-Cas9 se han generado ya cerdos *KO* para los genes *GGTA1* y *A3GalT2* ambos inactivos en humanos (Butler *et al.*, 2016). Estos genes codifican el epítipo  $\alpha$ -gal, responsable del rechazo hiperagudo que es la reacción fisiológica inicial y más destructiva en un trasplante. También se ha inactivado el gen *CMAH* que determina el antígeno *Neu5Gc* y *B4GalNT2* que codifica un glicano, ambos responsables del rechazo vascular agudo. Además, se han originado cerdos *KO* para el gen *MHC1* encargado de la activación de los linfocitos T y las células *Natural-Killer*, responsables del rechazo celular.

Otra de las preocupaciones en el área de los xenotrasplantes, es la posibilidad, aunque remota, de activación y transmisión de retrovirus endógenos porcinos (PERV). En este sentido, ha resultado crucial la investigación de Niu *et al.* (2017) quienes lograron, mediante CRISPR-Cas9, inactivar la totalidad de los PERV de un genoma porcino, utilizando dos sgRNA dirigidas al gen *pol* que codifica la transcriptasa inversa del virus.

#### Modificación de la composición de productos animales

En este caso, el objetivo es obtener productos de mayor calidad y más saludables para el hombre. En la gallina, la edición genética ha permitido modificar genes alergénicos de la clara de huevo, como la ovoalbúmina (OVA) y el ovomucoide (OVM), lo que reduce la respuesta inmunitaria de los individuos sensibles a artículos que contienen clara de huevo. En el estudio de Oishi *et al.* (2016), mediante microinyección del sistema CRISPR-Cas9 en los embriones, obtuvieron gallinas *KO* que producían huevos de menor alergenicidad. En el cerdo, con el objetivo de aumentar la calidad de la carne se ha usado el sistema CRISPR-Cas9 para incrementar su contenido en ácidos grasos omega 3 ( $\omega$ -3), de conocidas propiedades cardioprotectoras y anticancerígenas. Se consiguió mediante la inserción del gen *fat-1* del nematodo *Caenorhabditis elegans* en el intrón 1 del locus *ROSA26* del genoma de cerdo. El gen *fat-1* codifica la enzima desaturasa n-3, de la que carecen la mayoría de mamíferos, y que permite transformar los ácidos grasos  $\omega$ -6 en  $\omega$ -3, reduciendo así la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (Fig. 8A)(Li *et al.*, 2018).

### Animales como biorreactores

Se pueden obtener proteínas recombinantes de interés terapéutico a partir de animales modificados genéticamente (individuos *KI*). Por ejemplo, debido a la escasez de suministro de sangre humana y los riesgos asociados a la transmisión de enfermedades, se ha buscado la producción alternativa de albúmina sérica humana (HSA) en animales. La HSA es la proteína plasmática más abundante, desempeña funciones homeostáticas importantes en la fisiología humana y se utiliza como tratamiento para el fallo hepático y shock traumático. Mediante el sistema CRISPR-Cas9 se ha insertado el gen *ALB* humano en el exón 1 del locus *ALB* de cerdo. De esta manera se expresa la HSA al mismo tiempo que se bloquea la expresión endógena de la albúmina de cerdo, facilitando la purificación de la proteína humana (Peng *et al.*, 2015). También se ha conseguido producir interferón- $\beta$  humano (hIFN- $\beta$ ) en la clara de huevo de gallina. Esta proteína se utiliza para el tratamiento de enfermedades como la hepatitis C o la esclerosis múltiple. Para ello, Oishi *et al.* (2018) insertaron, mediante el sistema CRISPR-Cas9, el gen *hIFN- $\beta$*  en el locus *OVA* obteniendo gallinas transgénicas que producían una elevada concentración de hIFN- $\beta$  biológicamente activo en la clara de los huevos. En estos, la porción de la clara más cercana a la yema era blanquecina y turbia, demostrándose que era la zona de mayor depósito de la proteína recombinante (Fig. 8B). Por último, indicar que se han obtenido anticuerpos humanos a partir de cerdos que carecen de células B endógenas, evitando así que se produzca el reconocimiento de los anticuerpos y se destruyan. Se ha conseguido en cerdos mediante la inactivación de la secuencia de la cadena pesada de la IgM necesaria para la supervivencia de las células B durante el desarrollo temprano (Chen *et al.*, 2015).

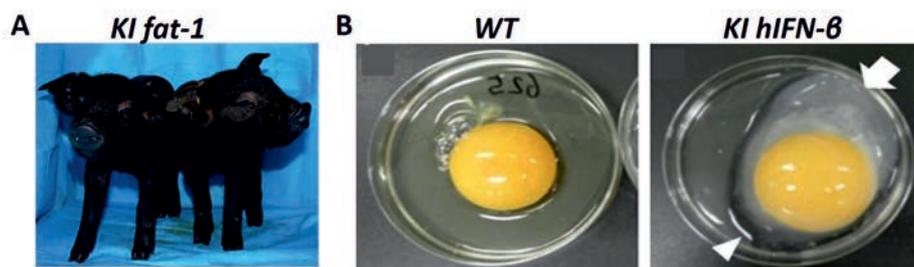


Figura 8. A) Cerdos con el gen *fat-1* insertado (Li *et al.*, 2018). B) Huevos de gallinas *WT* y *KI*. Se señala con una flecha la zona de mayor depósito de la proteína recombinante (Oishi *et al.*, 2018).

### Consideraciones finales

En relación con las posibilidades de utilización en la práctica de los animales editados genéticamente y, si nos centramos en el momento actual, esta difiere según la aplicación. Los modelos animales de enfermedad se están aplican-

do en Biomedicina, y se realizan ya ensayos clínicos de xenotrasplantes en primates y, previsiblemente, en humanos en un futuro próximo. De igual modo, puesto que ya están autorizadas algunas proteínas recombinantes humanas purificadas a partir de la leche (antitrombina III e inhibidor de la esterasa C1) o huevos (lipasa ácida lisosómica) de animales transgénicos convencionales, se espera que otras obtenidas mediante edición genética, como el interferón- $\beta$  humano descrito anteriormente, sean aprobadas por las agencias reguladoras correspondientes. Sin embargo, los productos de origen animal destinados al consumo están sometidos a una normativa mucho más estricta. De hecho, en la actualidad, solamente hay un producto animal, el salmón transgénico, cuya comercialización está permitida en países como Estados Unidos y Canadá. A pesar de que los expertos han concluido que los productos de animales editados genéticamente no representan un riesgo mayor para el consumidor (revisado por Lamas-Toranzo *et al.*, 2017), su comercialización en EEUU precisa una evaluación reglamentaria obligatoria y, en la Unión Europea cuya política es más restrictiva en estos temas, esta prohibida al ser considerados OMGs. Esta situación es un reflejo de la reacción negativa del público hacia la transgénesis animal, por lo que mejorar la percepción pública hacia la modificación genética es esencial para la aplicación del sistema CRISPR-Cas9. Por otro lado, el bienestar animal es una preocupación asociada a cualquier experimentación animal, regulada por normativas específicas orientadas al principio de las 3R (reemplazar los animales por otras opciones cuando sea posible, reducir su número al mínimo necesario y refinar los procedimientos). En este sentido, es interesante destacar que, en comparación con las tecnologías anteriores, CRISPR reduce el número de animales requeridos para generar la modificación. Las distintas aplicaciones también pueden influir en la opinión de los consumidores, ya que es más probable que estos acepten modificaciones destinadas a mejorar, por ejemplo, la resistencia a las enfermedades que las dirigidas a caracteres productivos de los animales (Van Eenennaam *et al.*, 2019).

Se puede concluir que la aparición de los editores genéticos, especialmente el sistema CRISPR-Cas9, ha permitido generar animales modificados genéticamente de forma más sencilla y eficiente. A pesar de su reciente implantación en animales domésticos, ha conseguido ya resultados relevantes en los ámbitos de la Biomedicina y la Producción Animal, aunque es necesaria una regulación adecuada basada en criterios científicos. Finalmente, indicar que la aceptación social precisa de una mayor información a los ciudadanos sobre la edición genética.

## Bibliografía

- Burkard, C., Lillico, S. G., Reid, E., Jackson, B., Mileham, A. J., Ait-Ali, T., Whitelaw, C. B. A. y Archibald, A. L. 2017. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathogens* 13:1-28
- Burkard, C., Opriessnig, T., Mileham, A. J., Stadejek, T., Ait-Ali, T., Lillico, S. G., Whitelaw, C. B. A. y Archibald, A. L. 2018. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection. *Journal of Virology* 92:1-13
- Butler, J. R., Skill, N. J., Priestman, D. L., Platt, F. M., Li, P., Estrada, J. L., Martens, G. R., Ladowski, J. M., Tector, M. y Tector, A. J. 2016. Silencing the porcine iGb3s gene does not affect Gal $\alpha$ 3Gal levels or measures of anticipated pig-to-human and pig-to-primate acute rejection. *Xenotransplantation* 23:106-116
- Chen, F., Wang, Y., Yuan, Y., Zhang, W., Ren, Z., Jin, Y., Liu, X., Xiong, Q., Chen, Q., Zhang, M., *et al.* 2015. Generation of B cell-deficient pigs by highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene targeting. *Journal of Genetics and Genomics* 42:437-444
- Doe, B., Brown, E. y Boroviak, K. 2018. Generating CRISPR/Cas9-Derived Mutant Mice by Zygote Cytoplasmic Injection Using an Automatic Microinjector. *Methods and protocols* 1:1-12
- Fan, Z., Perisse, I. V., Cotton, C. U., Regousky, M., Meng, Q., Domb, C., van Wettere, A. J., Wang, Z., Harris, A., White, K. L. y Polejaeva, I. A. 2018. A sheep model of cystic fibrosis generated by CRISPR/Cas9 disruption of the CFTR gene. *JCI Insight* 3:1-12
- Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, X., Zhang, J. y Zhang, Y. 2017. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology* 18:1-15
- Hashimoto, M. y Takemoto, T. 2015. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Scientific Reports* 5:1-7
- Ikeda, M., Matsuyama, S., Akagi, S., Ohkoshi, K., Nakamura, S., Minabe, S., Kimura, K. y Hosoe, M. 2017. Correction of a disease mutation using CRISPR/Cas9-assisted genome editing in japanese black cattle. *Scientific Reports* 7:1-9
- Lamas-Toranzo, I., Guerrero-Sánchez, J., Miralles-Bover, H., Alegre-Cid, G., Pericuesta, E. y Bermejo-Álvarez, P. 2017. CRISPR is knocking on barn door. *Reproduction in Domestic Animals* 52:39-47
- Li, M., Ouyang, H., Yuan, H., Li, J., Xie, Z., Wang, K., Yu, T., Liu, M., Chen, X., Tang, X., *et al.* 2018. Site-specific fat-1 knock-in enables significant decrease of n-6PUFAs/n-3PUFAs ratio in pigs. *Genes|Genomes|Genetics* 8:1747-1754
- Lin, H., Deng, Q. y Shi, L. (2019). Application and development of CRISPR/Cas9 technology in pig research. En *Gene Editing - Technologies and Applications*

- (eds. Chen, Y. C. y Che, S. J.) doi: 10.5772/intechopen.85540
- Niu, D., Wei, H. J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I. H., Zhao, H. Y., Wang, Y., Kan, Y., Shrock, E., *et al.* 2017. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science* 357:1303-1307
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D., Kagami, H. y Tagami, T. 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6:1-10
- Oishi, I., Yoshii, K., Miyahara, D. y Tagami, T. 2018. Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Scientific Reports* 8:1-12
- Park, K. E., Kaucher, A. V., Powell, A., Waqas, M. S., Sandmaier, S. E. S., Oatley, M. J., Park, C. H., Tibary, A., Donovan, D. M., Blomberg, L. A., *et al.* 2017. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Scientific Reports* 7:1-9
- Peng, J., Wang, Y., Jiang, J., Zhou, X., Song, L., Wang, L., Ding, C., Qin, J., Liu, L., Wang, *et al.* 2015. Production of human albumin in pigs through CRISPR/Cas9-mediated knockin of human cDNA into swine albumin locus in the zygotes. *Scientific Reports* 5:1-6
- Tait-Burkard, C., Doeschl-Wilson, A., McGrew, M. J., Archibald, A. L., Sang, H. M., Houston, R. D., Whitelaw, C. B. y Watson, M. 2018. Livestock 2.0 - genome editing for fitter, healthier, and more productive farmed animals. *Genome Biology* 19:1-11
- Tanihara, F., Takemoto, T., Kitagawa, E., Rao, S., Do, L.T.K., Onishi, A., Yamashita, Y., Kosugi, C., Suzuki, H., Sembon, S., *et al.* 2016. Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Science Advances* 2:1-8
- Van Eenennaam, A. L., Wells, K. D. y Murray, J. D. 2019. Proposed U.S. regulation of gene-edited food animals is not fit for purpose. *Nature Partner Journals* 3:1-7
- Wang, X., Cai, B., Zhou, J., Zhu, H., Niu, Y., Ma, B., Yu, H., Lei, A., Yan, H., Shen, Q., *et al.* Y. 2016a. Disruption of FGF5 in cashmere goats using CRISPR/Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers. *PLoS ONE* 11:1-12
- Wang, X., Cao, C., Huang, J., Yao, J., Hai, T., Zheng, Q., Wang, X., Zhang, H., Qin, G., Cheng, J., *et al.* 2016b. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6:1-7
- Whitelaw, C. B. A., Sheets, T. P., Lillico, S. G. y Telugu, B. P. 2015. Engineering large animal models of human disease. *Journal of Pathology* 238:247-256
- Whitworth, K. M. y Prather, R. S. 2017. Gene editing as applied to prevention of reproductive porcine reproductive and respiratory syndrome. *Molecular Reproduction and Development* 84:926-933
- Zhang, Y., Wang, Y., Yulin, B., Tang, B., Wang, M., Zhang, C., Zhang, W., Jin, J., Li, T., Zhao, *et al.* 2019. CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMSCs differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 120:1794-1806
- Zhou, X., Wang, L., Du, Y., Xie, F., Li, L., Liu, Y., Liu, C., Wang, S., Zhang, S., Huang, X.,



*et al.* 2016. Efficient generation of gene-modified pigs harboring precise orthologous human mutation via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair in zygotes. *Human Mutation* 37:110-118

Zhou, X., Xin, J., Fan, N., Zou, Q., Huang, J., Ouyang, Z., Zhao, Y., Zhao, B., Liu, Z., Lai, S., *et al.* 2014. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72:1175-1184.

## SIGUIENDO LA PISTA

### Exhumación en Canseco (Cármenes, León): Estudio antropológico y paleopatológico

Miriam Serralvo González

Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León. Alumna de máster (curso 2019-2020). [mserrgol@estudiantes.unileon.es](mailto:mserrgol@estudiantes.unileon.es)

#### Resumen

En el presente trabajo se expone el estudio antropológico y paleopatológico realizado en tres individuos fallecidos durante la Guerra Civil Española, y exhumados en la localidad leonesa de Canseco.

Previo al estudio antropológico, para la facilitación de su análisis, los restos fueron dispuestos en conexión anatómica. Los tres individuos eran de sexo masculino, de mediana edad y de una estatura en torno a los 165 cm.

Una vez finalizado dicho estudio, se llevó a cabo el análisis paleopatológico, detectándose hernias discales, nódulos de Schrmöl y entesopatías, así como caries, hipoplasias y alteraciones para-masticatorias.

Se destaca la presencia de espina bífida oculta en dos de los individuos; por su carácter genético, pudiendo estar relacionada con procesos de endogamia.

Se exponen las posibles patologías causantes de la muerte de estos individuos, todas ellas ocasionadas por armas de fuego y metralla.

Palabras clave: *Ante mortem*, artropatías, hipoplasia, marcador músculo-esquelético, *peri mortem*.

#### Introducción

Durante la Guerra Civil española se libraron numerosas acciones de guerra en la línea de frente. En muchas ocasiones, los restos de las personas fallecidas desaparecieron o fueron enterrados en lugares desconocidos para sus familiares. Es por ello, que la Asociación para la Recuperación de la Memoria Histórica (ARMH), se encarga de la recuperación de los restos óseos de estas personas.

En este caso, se buscan los restos de cuatro milicianos. Según los informes proporcionados por la ARMH, estos individuos fueron abatidos en el frente de Villanueva de Pontedo (León), e inhumados en el cementerio de Canseco (municipio de Cármenes, León).

El proceso de exhumación fue realizado por la ARMH, contando con la colaboración del Área de Antropología Física de la Universidad de León, que lo do-

Forma de mencionar este artículo: Serralvo González, M. 2019, Exhumación en Canseco (Cármenes, León): Estudio antropológico y paleopatológico. *AmbioCiencias*, 17, 46-56. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

cumentó adecuadamente (Asociación para la Recuperación de la Memoria Histórica, 2018; sin publicar).

Dicho trabajo se llevó a cabo en junio de 2018, en la zona sureste del cementerio de Canseco, donde fueron halladas dos sepulturas, con los restos óseos de tres individuos, dispuestos en conexión anatómica, en fosas de tipo primario (López, 2003).

El principal objetivo de este trabajo es realizar el estudio antropológico y paleopatológico, para así, conocer los distintos hábitos de vida de los individuos, las patologías sufridas en vida, así como la posible causa de muerte. Además, para comprobar si los restos óseos exhumados se corresponden con alguna de las identidades que han sido propuestas en informes proporcionados por la ARMH, se cuenta con análisis de ADN.

Mediante el estudio paleopatológico se observan las distintas alteraciones dentales y óseas, tanto *ante mortem* como *peri mortem* y *post mortem*.

En lo referente a la dentición, la presencia o ausencia, de patologías como caries, cálculo dental, lesiones pulpoalveolares y alteraciones no patológicas como hipoplasias, alteraciones paramasticatorias y desgaste dental, permite hacer una aproximación al tipo de alimentación de los individuos, su actividad ocupacional, así como posibles deficiencias nutricionales sufridas en vida.

Las alteraciones para-masticatorias, se encuentran ligadas a la actividad diaria del individuo. Normalmente están ocasionadas por el uso de los dientes como una “tercera mano” (Bonfiglioli *et al.*, 2004; Scott y Burgett, 2008; Molnar, 2011). Entre ellas pueden encontrarse “Chipping”, “Notching” y LSAMAT (“Lingual Surface Attrition or Abrasion of the Maxillary Anterior Teeth”), caracterizadas por alteraciones del esmalte, tanto por rotura como por depresiones e incluso abrasiones de la superficie lingual (Bonfiglioli *et al.*, 2004; Molnar, 2011).

En el esqueleto post-craneal, las alteraciones óseas quedan reflejadas, entre otras, como hernias discales y nódulos de Schrmöl. Ambas son consecuencia de la salida del núcleo pulposo de los platillos vertebrales, debido a un debilitamiento del mismo. Cuando esta salida ocurre de forma horizontal, se produce una hernia discal, en cambio, cuando ocurre verticalmente, se produce un nódulo de Schrmöl (Suby, 2014; Campo, 2003). Estas patologías, junto a los marcadores músculo-esqueléticos y las entesopatías, permiten conocer el tipo de actividades realizadas por los individuos, dado que todas ellas están relacionadas con acciones que implican actividades físicas repetitivas y de elevado estrés mecánico (Galtés *et al.*, 2007).

Por último, relacionadas con la posible causa de la muerte, se encuentran

las lesiones *peri mortem*, caracterizadas por presentar una superficie de fractura lisa e irregular (Gómez-González y Martín, 2018). En este caso, son importantes aquellas que puedan estar relacionadas con armas de fuego, dado el contexto en el que fallecieron estas personas.

### Material y métodos

Para la toma de medidas se emplearon la tabla osteométrica GPM Gneupel, el calibre digital POWERFIX Profi modelo N°HG00962A, un compás de espesor GPM y una cinta métrica.

Con el fin de registrar lo más detalladamente posible las distintas patologías y las alteraciones *post mortem*, se tomaron imágenes mediante una cámara fotográfica OLYMPUS SP-810UZ (14 megapixel) y un microscopio digital HD (200X) para PC.

En primer lugar, los restos óseos de los tres individuos exhumados se dispusieron en conexión anatómica, identificándose como Individuo 1.1, Individuo 1.2 e Individuo 2.2, correspondiendo el primer número a la fosa y el segundo al número de individuos hallados en cada una.

A continuación, se contabilizó el número de fragmentos de cada hueso y se realizó la cuantificación de dientes.

Una vez realizadas todas las medidas de los huesos largos, se emplean las longitudes totales de húmero y fémur, así como la longitud fisiológica del fémur, para estimar la estatura, siguiendo la metodología de Mendonça (2000).

Para estimar el sexo se siguió la metodología propuesta por White y Folkens, (2005), en la cual se observan las diferencias craneales y mandibulares entre hombres y mujeres, así como las diferencias presentes en los coxales.

Con el fin de aproximarnos lo más posible a la edad del individuo, se analizaron los cambios morfológicos de la superficie auricular y de la sínfisis púbica, propuestos por White y Folkens (2005), así como la transparencia radicular dental, la cual aumenta con la edad de los individuos, siguiendo la metodología propuesta por Megyesi *et al.* (2006).

Los análisis de ADN fueron llevados a cabo por LabGenetics (Laboratorio de Genética Clínica S.L.). Se compararon entre sí muestras de familiares de primer grado (padres e hijos). Las muestras de las personas interesadas en la búsqueda de sus familiares, se obtuvieron mediante hisopos, recogiendo células del epitelio bucal. Por otro lado, las muestras correspondientes a los restos óseos exhumados, se obtuvieron principalmente de molares, ya que es donde mejor se conserva el ADN ante los procesos degradantes.

Para ello, se amplificaron 24 regiones polimórficas de tipo STR (*Short*

*Tandem Repeats*), mediante PCR, y se detectaron los distintos alelos por electroforesis capilar y marcaje fluorescente. Para la aproximación estadística se emplearon frecuencias propias del laboratorio, representativas de la población española. Finalmente, con los resultados obtenidos se realizó un estudio de exclusión y de probabilidad de paternidad.

**Resultados**

Tras la realización de las medidas mencionadas anteriormente, así como tras la estimación de estatura, sexo y edad de los individuos, los resultados obtenidos se presentan recogidos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Resultados de las estimaciones de estatura, edad y sexo de los tres individuos.

INDIVIDUO 1 FOSA 1	
Estatura	$\bar{X}$ =164'33 cm
Edad	35'67-36'94
Sexo	Masculino
INDIVIDUO 1 FOSA 2	
Estatura	$\bar{X}$ = 164'33 cm
Edad	34'11-38'45
Sexo	Masculino
INDIVIDUO 2 FOSA 2	
Estatura	$\bar{X}$ = 167'16 cm
Edad	30'51-42'06
Sexo	Masculino

Dentición

Se encuentran caries y cálculo dental en los 3 individuos. La elevada presencia de estas patologías podría estar ocasionada por una baja higiene dental, acompañada de una dieta rica en carbohidratos (González *et al.*, 2009).

En lo referente a las alteraciones dentales no patológicas, las hipoplasias, son anomalías estructurales, ocasionadas durante la formación del esmalte dental (Lukacs *et al.*, 2001; Bocaege y Hillson, 2016). Esta alteración puede deberse a factores genéticos, estrés metabólico sistémico o traumas localizados. Puesto que la segunda causa es la más común en poblaciones humanas (Novellino y Gil, 2006), es probable que el origen de las mismas sea el estrés metabólico ocasionado por déficits nutricionales.

Además, se observan distintas alteraciones para-masticatorias, relacionadas con el uso de los dientes en distintas prácticas culturales (Cruwys *et al.*, 1992; Bonfiglioli *et al.*, 2004; Scott y Burgett, 2008; Molnar, 2011; Scott y Winn, 2011; Gómez-González, 2012).

En el individuo 1.1, concretamente en los incisivos maxilares, se localizaron “chippings” (Fig. 1), así como una alteración para-masticatoria de forma redondeada, cuya causa pudo ser la sujeción continuada de un objeto circular entre ambos dientes (Molnar, 2011).



Figura 1. “Chippings” en incisivo central maxilar izquierdo (I) y derecho (D) del individuo 1.1. Fotografía tomada por microscopía óptica digital (Autora: Dra. Susana Gómez-González).

En el individuo 1.2 además de la presencia de alteraciones para-masticatorias, destaca la conservación de los segundos molares mandibulares deciduos, propios de un individuo infantil.

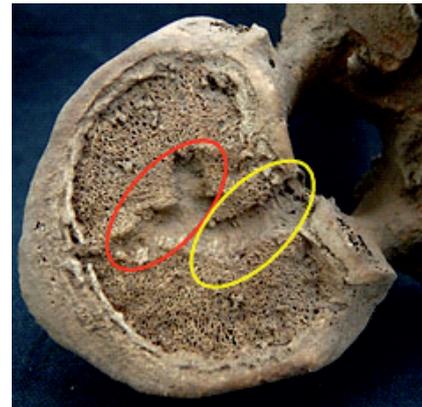
### Estudio post-craneal

En los 3 individuos se hallaron marcadores relacionados con actividades ocupacionales de elevado estrés mecánico.

En la columna vertebral de los individuos 1.1 y 2.2, se localizaron nódulos de Schmörl y hernias discales (Fig. 2). Además, el individuo 2.2, presentaba una osificación de los ligamentos amarillos vertebrales en distintas vértebras torácicas (Mann y Hunt, 2005).

En las extremidades superiores del individuo 1.2, se encuentran marcadores musculo-esqueléticos en ambas apófisis coracoides de la escápula, correspondientes a la inserción del músculo pectoral menor, el cual es un músculo escapulo-torácico. Este marcador indica que este individuo realizaba acciones de elevado estrés mecánico que implicaban las extremidades superiores, realizando sobre todo movimientos con los hombros (Mariotti *et al.*, 2007; Galtés *et al.*, 2007, Al-Oumaoui *et al.*, 2004 y Samsel *et al.*, 2014).

Figura 2. Nódulo de Schrmöl (rojo) y hernia discal (amarillo) en vertebra torácica 8 del individuo 1.1.



En cuanto a extremidades inferiores, se detectó artrosis bilateral en ambas falanges distales de los hallux de ambos pies del individuo 1.1. El individuo 2.2 presentaba una entesopatía correspondiente a la inserción del ligamento rotuliano de la tibia derecha, reflejada como una exóstosis ósea e irregular de la superficie del hueso (Fig. 3). (Malgosa, 2003; Galtés y Malgosa, 2007). Dicha entesopatía puede llegar a afectar a la funcionalidad normal del ligamento, alterando la movilidad de la rodilla y la extensión de la pierna (Mariotti *et al.*, 2007).



Figura 3. Entesopatía por inserción del ligamento rotuliano en tibia derecha del individuo 2.2.

Tanto en el individuo 1.2 como en el individuo 2.2, se observó la presencia de espina bífida oculta o disrafismo, una patología poco común pero asintomática. Se localiza en la zona dorsal del sacro, y se produce como consecuencia de una fusión incompleta del tubo neural durante el desarrollo embrionario (Zemirline *et al.*, 2007). Sin embargo, la espina bífida oculta es asintomática (Subirana *et al.*, 2013).

En lo referente a las patologías *peri mortem*, en el individuo 1.1, se hallaron dos orificios redondeados, localizados en el cuello quirúrgico del húmero iz-

Figura 4. Cuello quirúrgico del húmero izquierdo del individuo 1.1. Se observan los orificios de un proyectil (flechas amarillas), así como las líneas de estallido causadas por el mismo (flechas negras).



quierdo, posiblemente ocasionados por el impacto de un proyectil (Fig. 4). En el individuo 2.2, se localizaron fracturas de bordes suaves e irregulares en ambos peronés (Gómez-González y Martín, 2018). La causa más probable es el impacto de metralla, ya que se pudo ver un fragmento metálico aún incrustado en el hueso (Fig. 5). Además, en el mismo individuo, se encontró una marca rojiza en el fémur derecho, consecuencia de la transferencia de color de un torniquete realizado en vida (Fig. 6).

Sin embargo, en el individuo 1.2, no se observaron lesiones *peri mortem* relevantes.



Figura 5. Peroné del individuo 2.2 en el cual puede observarse un fragmento metálico todavía incrustado en el hueso.



Figura 6. Imagen del torniquete realizado en vida (A), y transferencia de color rojizo en el fémur derecho del individuo 2.2 (B). Imagen A cedida por la ARMH.

Entre los objetos asociados a los restos óseos de los individuos 1.1 y 1.2 se encontraron distintos botones de nácar, probablemente de camisa. En cambio, junto al individuo 2.2, se hallan, además de un botón y una hebilla de metal, los zapatos, en los cuales aún se conservaban en su interior los huesos correspondientes a los pies.

Por último, en lo referente a los resultados de ADN, para el individuo 1.2 se obtuvo un valor para la probabilidad de paternidad del 99'99999%, por lo cual se pudo establecer una paternidad prácticamente probada en relación al familiar del cual se tomó la muestra de ADN. Por lo tanto, se confirma que el individuo 1.2 se corresponde con Leonardo González.

Por el contrario, para los individuos 1.1 y 2.2, no se obtuvieron resultados que permitiesen relacionar los restos óseos con ninguna de las identidades buscadas.

### Discusión y conclusiones

Puesto que se hallan hipoplasias dentales en los tres individuos, y que una de sus causas puede ser el estrés metabólico ocasionado por déficit nutricional, cabría pensar que, este último también podría estar relacionado con la estatura de los individuos, ya que se encuentran dentro de la media de los nacidos a principios del siglo XX en regiones agrarias de Castilla y León, en los cuales se ha visto una correlación entre la estatura y los recursos alimenticios (Moreno y Martínez, 2009). Sin embargo, se desconoce el origen de dos de los tres individuos, por lo que no se puede confirmar dicha correlación.

Destaca la presencia de espina bífida oculta de los individuos 1.2 y 2.2. Debido a su carácter hereditario, es posible que su presencia esté ligada al aislamiento genético sufrido antiguamente en algunos de los pueblos de montaña (Núñez, 2015). No obstante, entre sus causas también pueden encontrarse distintas alteraciones genéticas, exposición a compuestos teratogénicos y diversos componentes ambientales (Silva-Pinto et al., 2010), entre otras. Por lo tanto, para confirmar una posible causa de espina bífida por endogamia, sería necesario un estudio genético en el que se analizase si los polimorfismos empleados en el estudio de ADN se encuentran en homocigosis o no.

Dadas las circunstancias que rodean la causa de muerte de estos individuos, es necesario resaltar las patologías *peri mortem*. Estas patologías podrían estar relacionadas con el armamento empleado en la Guerra civil, puesto que en la exhumación fueron hallados casquillos de 7x57-Mauser (Manrique y Franco, 2005) y restos de metralla. Según esto, es bastante probable que la causa de muerte de estos individuos, haya sido como consecuencia de un desangramiento

debido a las heridas sufridas durante el conflicto.

Se concluye, que los individuos de este estudio se corresponden con tres varones de edades comprendidas entre 30 y 40 años, con una estatura media de 165 cm. Prevalece la presencia de hipoplasia, caries, y cálculo dental en todos ellos, así como patologías y marcadores musculoesqueléticos ligados a las actividades ocupacionales.

Es probable que estos hombres fueran enterrados todavía uniformados, puesto que los restos óseos aparecen asociados a distintas piezas de ropa y uno de ellos, junto a sus zapatos. Además, en el informe arqueológico proporcionado por la ARMH, se encuentran otros objetos asociados, hallados durante la exhumación, entre los que se encuentra un galón de rango militar, perteneciente al individuo 1.2.

## Bibliografía

- Al-Oumaoui, S., Jiménez-Brobeil, S., du Souich, P. 2004. Markers of activity patterns in some populations of the Iberian Peninsula. *International Journal of Osteoarchaeology* 14:343-359
- Asociación para la Recuperación de la Memoria Histórica. 2018. Informe de la exhumación de dos fosas, individual y doble, en el cementerio de Canseco (Cármenes, León). Sin publicar.
- Bocaege, E. y Hillson, S. 2016. Disturbances and noise: Defining furrow-form enamel hypoplasia. *American Journal of Physical Anthropology* 161:744-751
- Bonfiglioli, B., Marotti, F., Facchini, F., Belcastro, M.G. y Condemi, S. 2004. Masticatory and non-masticatory dental modifications in the epipalaeolithic necropolis of Taforalt (Morocco). *International Journal of Osteoarchaeology* 14:448-456
- Campo, M. 2003. Paleopatología de la columna vertebral. En *Paleopatología, la Enfermedad no Escrita* (eds. Isidro, L. A. y Malgosa, M. A), pp. 163-193, MASSON, S.A., Barcelona, España
- Cruwys, E., Robb, N.D. y Smith, S.G.N. 1992. Anterior tooth notches: an anglo-saxon case study. *Journal of Paleopathology* 4:211-220
- De Mendonça, M.C. 2000. Estimation of height from the length of long bones in a Portuguese adult population. *American Journal of Physical Anthropology* 112:39-48
- Galtés, I., Jordana, X., García, C. y Malgosa, A. 2007. Marcadores de actividad en restos óseos. *Cuadernos de Medicina Forense*. 13:179-189
- Galtés, I. y Malgosa, M. A. 2007. Atlas metodológico para el estudio de marcadores músculo-esqueléticos de actividad en el radio. *Paleopatología* 3:1-33
- Gómez-González, S. 2012. Paleopatología dental de poblaciones históricas (siglos III-XIII) en la provincia de Alicante: estudio de la variabilidad como respuesta a factores de hábitat y dieta. Tesis doctoral. Universidad de Alicante, España. Disponible en: Repositorio Institucional de la Universidad de Alicante

(<http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/32339>)

- Gómez-González, S. y Martín, A. 2018. Estudio antropológico de un individuo hallado en el edificio religioso medieval de la plaza Eduardo de Castro (Astorga, España). ¿Muerte accidental o intencionada? *Munibe Antropología-Arkeología* 69:297-309
- González, A., Martínez, T., Alfonzo, N., Rodríguez, J.A. y Morales, A. 2009. Caries dental y factores de riesgo en adultos jóvenes. Distrito Capital, Venezuela. *Revista Cubana de Estomatología*. 46:30-37
- López, L. 2003. Métodos de conservación de material óseo. En *Paleopatología, la Enfermedad no Escrita* (eds. Isidro, L. A. y Malgosa, M. A), pp. 25-32, MASSON, S.A., Barcelona, España
- Lukacs, J. R., Walimbe, S. R. y Floyd, B. 2001. Epidemiology of enamel hypoplasia in deciduous teeth: explaining variation in prevalence in western India. *American Journal of Human Biology* 13:788-807
- Malgosa, A. 2003. Análisis poblacional. En *Paleopatología, la Enfermedad no Escrita* (eds. Isidro, L. A. y Malgosa, M. A), pp. 57-65, MASSON, S.A., Barcelona, España
- Mann, R. y Hunt, D. 2005. *Photographic regional atlas of bone disease*. 2nd. ed. Charles C Thomas Publisher LTD, Springfield, Estados Unidos
- Manrique, JM. y Molina, JM. 2005. *Las armas de la Guerra Civil española*. Madrid: La Esfera de los Libros.
- Mariotti, V., Facchini, F. y Belcastro, M. G. 2007. The study of entheses: proposal of a standardized scoring method for twenty-three entheses of the postcranial skeleton. *Collegium Antropologicum* 31:291-313
- Megyesi, M. S., Ubelaker, D.H. y Sauer, N.J. 2006. Test of the Lamendin aging method on two historic skeletal samples. *American Journal of Physical Anthropology* 131:363-367
- Molnar, P. 2011. Extramasticatory dental wear reflecting habitual behavior and health in past populations. *Clinical Oral Investigations* 15:681-689
- Moreno, J. y Martínez, J. 2009. Evolución de la estatura en una región atrasada de la España interior: Castilla y León, 1830-1960. *Hispania. Revista Española de Historia* 69:209-234.
- Novellino, P. y Gil, A. 2007. Estrés nutricional, hipoplasia y explotación de recursos en el centro sur de Mendoza (Argentina). *Intersecciones en Antropología* 8:17-29
- Núñez Negrillo, A. 2015. Un siglo de matrimonios consanguíneos en la archidiócesis de Granada (1900-1999). Un análisis antropológico. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Disponible en: DIGIBUG: Repositorio Institucional de la Universidad de Granada (<https://digibug.ugr.es/>).
- Samsel, M., Kacki, S. y Villotte, S. 2014. Paleopathological diagnosis of spondyloarthropathies: Insights from de biomedical literatura. *International Journal of Paleopathology* 7:70-75
- Scott, G.R. y Burgett, R. 2008. Tooth-tool use and yarn production in Norse Greenland. *Alaska Journal of Anthropology* 6:253-263

- Scott, G.R. y Winn, J.R. 2011. Dental chipping: Contrasting patterns of microtrauma in inuit and european populations. *International Journal of Osteoarcheology* 21:723-731
- Silva-Pinto, V., Arriaza, B. y Standen V.2010. Evaluación de la frecuencia de espina bífida oculta y su posible relación con el arsénico ambiental en una muestra prehispanica de la Quebrada de Camarones, norte de Chile. *Revista Médica de Chile* 138:461-469
- Subirana, M., Font, G., Ortega, M. y Martínez, H. 2013. Mega apófisis transversa (síndrome de Bertolotti) y defecto parcial de fusión posterior sacra como signos con valor identificativo en antropología forense. *Cuadernos de Medicina Forense* 19:39-41
- Suby, J. 2014. Nódulos de Schmörl en restos humanos arqueológicos de Patagonia Austral. *Magallania* 42:135-147
- White, T.D y Folkens, P.A. 2005. The skeletal biology of individuals and populations. En *The human bone manual* (eds. Maragioglio N. y Sonnack, K.), pp 359 -418, Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido
- Zemirline, A., Vincent, J. P., Sid-Ahmed, S., Le Nen, D. y Dubrana, F. 2013. Lumbo-sacral malformations and spina bifida occulta in medieval skeletons from Brittany. *European Journal of Orthopedic Surgery and Traumatology* 23:149-153

## BAÚL DE LA CIENCIA

### La búsqueda del sensor celular del oxígeno, un camino al Nobel

María del Carmen Marín Vieira

Laboratorio de Diferenciación Celular y Diseño de Modelos Celulares, Instituto de Biomedicina (IBIOMED), Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, León, España

#### Resumen

El premio Nobel de Medicina y Fisiología ha sido otorgado este año a los investigadores William Kaelin Jr., Sir Peter Ratcliffe y Gregg Semenza por descubrir los mecanismos moleculares mediante los cuales las células detectan los cambios en los niveles de oxígeno y se adaptan a ellos. Las células de un organismo requieren oxígeno para oxidar los nutrientes y generar energía. Sin embargo, los tejidos pueden verse temporalmente privados de oxígeno (hipoxia). Por ello, durante la evolución las células han adquirido mecanismos que les permiten detectar cambios en los niveles de oxígeno y responder a ellos adaptando el metabolismo celular. Estos procesos adaptativos son fundamentales durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la homeostasis en adultos. Además, su desregulación juega un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades como la diabetes, el ictus o el cáncer. En este artículo me centraré en el trabajo que realizó uno de los galardonados, William Kaelin, el cual fue mi jefe y mentor en mi etapa posdoctoral. El Dr. Kaelin descubrió los mecanismos subyacentes a la respuesta a hipoxia estudiando una enfermedad rara que se caracteriza por la aparición de tumores altamente vascularizados, el síndrome de Von Hippel-Lindau. En la actualidad, centra sus esfuerzos en el diseño de terapias dirigidas contra dianas múltiples que, usadas en combinación, permitan en un futuro curar enfermedades complejas como el cáncer.

Palabras clave: Hipoxia, oxígeno, Von Hippel-Lindau (VHL), HIF, hidroxilación, proteasoma, degradación proteica.

#### Los primeros años del científico

Aunque el Premio Nobel le ha sido concedido por su aportación al conocimiento del mecanismo celular de la respuesta adaptativa al oxígeno, denominada en inglés “oxygen sensing” (detección del oxígeno), un investigador de su nivel no se hace en unos pocos años y sería injusto no mencionar las demás aportaciones de William Kaelin al campo de la biología tumoral. Es profesor de medicina de la Universidad de Harvard e investigador en el Instituto Dana Farber, perteneciente a la Facultad de Medicina de la misma universidad. Desde el 1997 es

Forma de mencionar este artículo: Marín, M.C. 2019, La búsqueda del sensor celular del oxígeno, un camino al Nobel. AmbioCiencias, 17, 57-71. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

investigador del Instituto Howard Hughes, en el 2007 fue elegido miembro de la Academia Nacional Americana de Medicina y en el 2010 miembro de la Academia Nacional de las Ciencias. A lo largo de su carrera le han otorgado premios tan prestigiosos como el Premio Lasker a la Investigación Médica, el premio de la Asociación Americana de Oncología Clínica y el Premio Princesa Takamatsu de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer. Pero para entender su forma de pensar hay que conocer su trayectoria científica. Es graduado en matemáticas y química por la Universidad de Duke, donde posteriormente se graduó en medicina. Tras realizar sus años de residencia en la Universidad de Johns Hopkins pasó a especializarse en oncología en el Instituto Dana Farber. Fue entonces cuando, pensando en dedicarse a la investigación, decidió formarse en el laboratorio de Dr. David Livingston especializándose en el estudio de genes supresores tumorales. Durante esta etapa su trabajo descifró uno de los nodos centrales de la regulación del ciclo celular: la interacción funcional entre la proteína retinoblastoma y el factor de transcripción E2F, (Chittenden *et al.*, 1991; Flemington *et al.*, 1993; Kaelin *et al.*, 1990; Kaelin *et al.*, 1992; Kaelin *et al.*, 1991).

El gen retinoblastoma (*RB1*) que codifica la proteína retinoblastoma (pRB) fue el primer gen supresor tumoral identificado. La inactivación de ambas copias de *RB1* es un evento necesario en la patogénesis del Retinoblastoma humano, un tumor maligno de células de la retina que puede ser hereditario, y un evento casi universal en la progresión de ciertos cánceres, como por el ejemplo el carcinoma de pulmón de células pequeñas, osteosarcomas o glioblastomas (Kaelin Jr, 1997). La proteína pRB es la responsable de mantener las células en quiescencia o reposo. Para que estas células puedan entrar en ciclo y dividirse se requiere la presencia de agentes pro-mitogénicos durante las fases iniciales hasta que se supera el llamado punto de restricción (R), tras el cual, las células estarán “obligadas” a entrar en fase S y duplicar su ADN (Fig. 1 a). Aunque la función de pRB se conocía, no así el mecanismo molecular por el que la llevaba a cabo. Los trabajos del Dr. Kaelin revelaron que la proteína pRB (hipofosforilada) mantenía a las células en quiescencia mediante su unión y represión al factor de transcripción E2F (Fig. 1 b). E2F, generalmente sobreexpresado en tumores, es necesario para inducir la expresión de los genes que codifican las proteínas que inducen la progresión del ciclo celular, las ciclinas A, E y B (Kaelin, 2003). La unión de factores mitogénicos a sus receptores celulares desencadena la activación de cascadas de señalización que desembocan en la expresión de la ciclina de la fase G1 (ciclina D). El complejo formado por la ciclina D unida a la quinasa dependientes de ciclina 4 (ciclina D-cdk4), fosforilarán a pRB, impidiendo esta modificación su unión y represión a E2F (Fig. 1 c). Una vez libre, E2F junto a su

cofactor DP serán capaces de transactivar múltiples genes diana, entre ellos los que codifican proteínas necesarias para la progresión del ciclo a la fase S, como por ejemplo los genes que codifican las ciclinas E y A. Además, E2F también es capaz de activar su propio promotor, generando un bucle de retroalimentación positiva que permitirá que, a partir del ese punto en la que se han alcanzado niveles suficientes de E2F, las células progresen a la fase S de duplicación del ADN, incluso en ausencia de señales externas de proliferación, pasándose así el punto de restricción R (Fig. 1 b, c). Este punto de control está frecuentemente alterado en células tumorales, expresando estas células altos niveles de E2F.

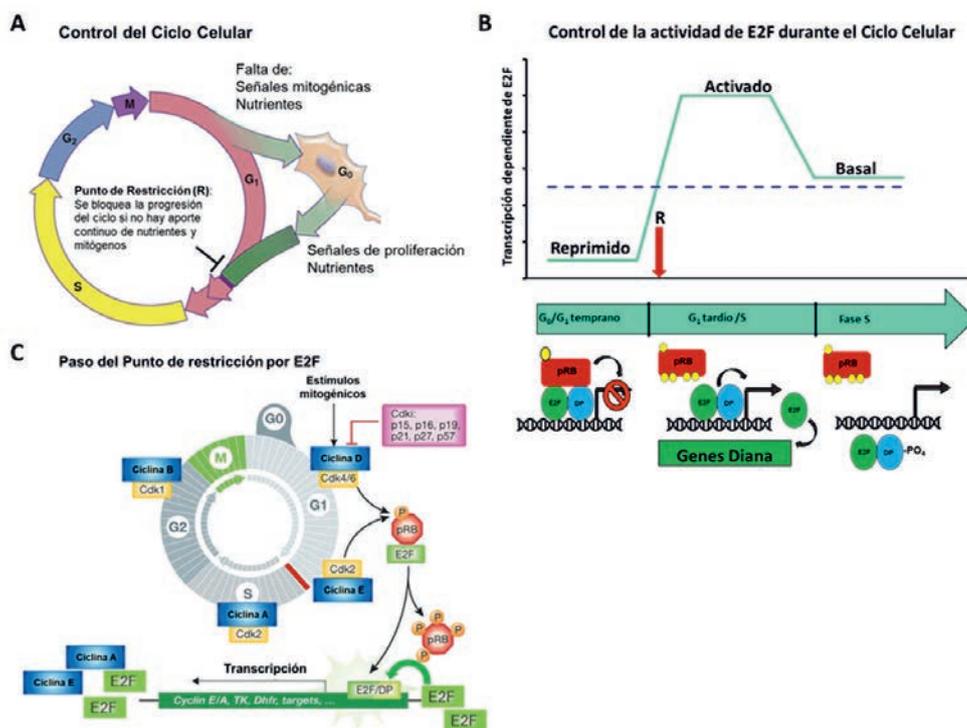


Figura 1. Control del ciclo celular por E2F y paso del punto de restricción (R).

Un laboratorio dedicado al estudio de genes supresores tumorales

Posteriormente, ya con su propio grupo de investigación, el Dr. Kaelin centró el trabajo de su laboratorio en el estudio de distintos genes supresores tumorales (GSTs). Los GST son genes involucrados en cáncer en los que es necesaria la inactivación de sus dos copias genómicas para que se manifieste un fenotipo tumoral. Como en el caso de *RB1*, los GST generalmente, pero no siempre, codifican proteínas que actúan como frenos del ciclo celular. Parte del laboratorio del Dr. Kaelin continuó estudiando los mecanismos que regulan a *RB1* y, sobre todo, la función de la sobreexpresión de E2F en tumores. Esto le llevo a otro des-

cubrimiento seminal, el hecho de que la sobreexpresión de E2F por encima de determinados niveles podía inducir muerte celular o apoptosis (Adams y Kaelin, 1996; Qin *et al.*, 1994). La relevancia de este descubrimiento estriba en que estas señales pro-apoptóticas, derivadas de la sobreexpresión de E2F, podrían sensibilizar a las células tumorales frente a quimioterapias convencionales. Surge así la idea de incorporar estrategias de modulación de E2F, junto con terapias anticancerígenas convencionales, utilizando pequeñas moléculas diseñadas para bloquear la interacción entre pRB y E2F. Esta idea de intentar paliar una enfermedad compleja, como es el cáncer, combinando múltiples terapias dirigidas frente a distintos reguladores de la progresión tumoral, no abandonó nunca al Dr. Kaelin y, como se verá más adelante, continúa siendo su objetivo a largo plazo.

Otra de las aportaciones excepcionales del Dr. Kaelin al campo de los GSTs, fue el ser pionero en la identificación y descripción del primer gen homólogo de *TP53*, el gen *TP73*. Identificado en 1970, el GST *TP53*, codifica el factor de transcripción p53 y es el gen más estudiado en la historia de la ciencia (Dolgin, 2017). Esto se debe a su función central en el mantenimiento de la estabilidad genómica, por lo que se le ha denominado el Guardián del Genoma (Lane, 1992). *TP53* se encuentra mutado en más del 50% de los cánceres humanos, pero incluso en aquellos en los que el gen no está mutado, la función de p53 suele estar inhibida (Kaelin, 1998). La función de p53 es fundamental en la respuesta a quimioterapia y mientras que los tumores con p53 mutado, responden peor a quimioterapia, la reintroducción de p53 funcional en células con p53-mutante induce la muerte celular, incrementado la sensibilidad a estos fármacos. Por ello, durante mucho tiempo se buscaron genes homólogos a *TP53* que pudiesen restaurar la función de p53 en células mutadas, pero los esfuerzos fueron infructuosos y se llegó a pensar que el gen *TP53* era único. Sin embargo, de manera totalmente fortuita, el Dr. Daniel Kaput encontró una secuencia génica con una gran homología con *TP53* y lo denominaron, *TP73* (Kaghad *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de la homología estructural no existían datos que demostrasen que este gen codificaba una proteína expresada de forma natural en las células o si dicha proteína, de existir, era capaz de ejercer funciones semejantes las de p53. Estos experimentos, cruciales para el reconocimiento del nuevo gen como homólogo funcional de *TP53*, se llevaron a cabo en el grupo del Dr. Kaelin y fue en los que yo participé (Irwin *et al.*, 2000; Jost *et al.*, 1997; Marin *et al.*, 1998). Tal vez, lo más relevante fue la demostración de que parte de la ganancia de función de los mutantes de p53 se debe a su unión e inactivación de la proteína p73, siendo esta interacción

crucial y determinante para la sensibilidad a quimioterapia en tumores humanos (Irwin *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2000). En su conjunto, los trabajos del grupo del Dr. Kaelin en este nuevo gen sentaron las bases de lo que sería un nuevo campo: el del estudio de la familia de p53.

### La enfermedad de Von Hippel-Lindau

Como oncólogo, al Dr. Kaelin le interesó la identificación de un gen supresor tumoral asociado con el desarrollo del carcinoma renal, uno de los 10 cánceres más frecuentes. Según sus palabras, “para avanzar en el conocimiento de la progresión tumoral hay que estudiar los cánceres más complejos y agresivos, como son los cánceres epiteliales”. Así decidió que el resto del laboratorio se centrara en estudiar un GST frecuentemente mutado en pacientes con un síndrome raro llamado de Von Hippel-Lindau (VHL). Esta enfermedad es un síndrome hereditario en el que los individuos afectados presentan una predisposición a desarrollar neoplasias benignas derivadas de los vasos sanguíneos denominadas hemangioblastomas (HB) en retina y en sistema nervioso central, así como feocromocitomas y carcinoma renal de células claras (CRCC). También es frecuente la aparición de quistes en diversos órganos como el páncreas o los riñones (Varshney *et al.*, 2017). El gen responsable de esta enfermedad es el GST *VHL*, el cual está localizado en el cromosoma 3p25 (Kaelin, 2007). Al igual que ocurre en otros cánceres hereditarios, como el retinoblastoma familiar, en las familias afectadas se detecta la transmisión germinal de un alelo mutado del GST y, para que se desarrolle la enfermedad, es necesaria la posterior inactivación somática del alelo restante. De manera semejante, la pérdida bialélica de *VHL*, por mutación somática o silenciamiento epigenético, es frecuente en el CRCC esporádico (80% de casos), el cáncer renal más frecuente (Kim y Kaelin, 2004; Shen y Kaelin, 2013).

Los GST clásicos, como *RB1*, *BRCA1*, suelen codificar proteínas que regulan el control del ciclo celular y suprimen el crecimiento de células tumorales en cultivo, o regulan los procesos de reparación genómica manteniendo la integridad genética, siendo denominados según su función en *Gatekeepers* (guardianes) o *Caretakers* (mantenedores), respectivamente (Ashworth *et al.*, 2011). Sin embargo, los primeros resultados obtenidos en el grupo sugerían que *VHL* no se acomodaba a estas definiciones. Cuando se reexpresaba *VHL* silvestre en células de CRCC carentes de él, no se afectaba su proliferación en cultivo, sin embargo, estas células no eran capaces de formar tumores en ratones inmunocomprometidos (Iliopoulos *et al.*, 1995). Estos datos iniciales sugerían que la función de *VHL* afectaba de alguna manera a las condiciones que se generaban durante la formación del tumor *in vivo* (Ohh *et al.*, 1998). Gracias a estos trabajos hoy

sabemos que el VHL corresponde a los GST denominados *Landscaper genes* o genes paisajistas, los cuales codifican proteínas cuya función reside en el mantenimiento de la homeostasis del microambiente, y su eliminación conduce a un microambiente transformante que afecta la proliferación celular en el tumor (Ashworth *et al.*, 2011).

Uno de los descubrimientos fundamentales para comprender la función de este gen, fue la observación de que los tumores asociados a la pérdida de VHL están altamente vascularizados, sugiriendo que la proteína codificada por este GST reprimía, de alguna manera, el proceso de la formación de vasos que irrigan al tumor, o angiogénesis tumoral (Gnarra *et al.*, 1996; Iliopoulos *et al.*, 1996; Siemeister *et al.*, 1996). El gen *VHL* codifica la proteína multifuncional pVHL (Kaelin, 2007). La estructura cristalizada de pVHL reveló que esta proteína consta de dos dominios independientes: el dominio- $\beta$  de mayor tamaño y el dominio- $\alpha$  (Fig. 2A) (Stebbins *et al.*, 1999). El hecho de que las mutaciones inactivantes que se detectan en tumores afecten a ambos dominios, sugiere que ambos son necesarios para su función de supresión tumoral (Fig. 2B) (Bérout *et al.*, 1998; Stebbins *et al.*, 1999).

#### El trabajo de William Kaelin: La función de la proteína pVHL

Precisamente, ha sido la elucidación del mecanismo molecular mediante el cual pVHL regula la respuesta celular al oxígeno por lo que se le ha otorgado a William Kaelin el Premio Nobel. Para identificar la función de la proteína pVHL comenzaron por la identificación de las proteínas a las que se unía. Varios grupos simultáneamente demostraron que pVHL, a través del su dominio- $\alpha$ , se une a las elonguinas B y C (Duan *et al.*, 1995; Kibel *et al.*, 1995) (Figura 2a). Las elonguinas B y C forman parte, junto a la elonguina A, de un complejo de elongación transcripcional (Elonguina-SIII) encargado de facilitar la transcripción génica. Por ello, inicialmente se propuso que VHL podía competir en la formación de este complejo y ejercer su función de supresión tumoral mediante la inhibición de la transcripción de algún factor en particular.

Los primeros descubrimientos fundamentales para la identificación de los genes diana de pVHL y de su función real, salieron a la luz unos pocos años después de mi incorporación en el laboratorio. En aquella época varios grupos, incluido el nuestro, publicaron que los tumores carentes de VHL no solo estaban hiper vascularizados, pero además secretaban factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), y, en algunos casos, presentaban altos niveles de eritropoyetina (EPO) (Berse *et al.*, 1992; Iliopoulos *et al.*, 1996; Wizigmann-Voos *et al.*, 1995). Como veremos más adelante, tanto el

VEGF como la EPO son factores que se secretan en respuesta a bajos niveles de oxígeno o hipoxia. Un dato fundamental vino de la mano de Othon Iliopoulos, quien demostró que las células carentes de *VHL* producían altos niveles de mRNAs correspondientes a genes de respuesta a hipoxia, independientemente de los niveles de oxígeno en el cultivo (Iliopoulos *et al.*, 1996). Esta fue la primera vez que se hizo la conexión entre la función de pVHL y regulación de la respuesta a hipoxia, proponiéndose que pVHL llevaba a cabo una función necesaria en la respuesta a los niveles de oxígeno. De manera sorprendente, se constató que tanto la localización mayoritariamente citoplásmica de pVHL, como el hecho de que el efecto de pVHL sobre los mRNAs de genes de respuesta a hipoxia parecía ser postranscripcional, apoyaban un nuevo modelo en el que pVHL regulaba la estabilidad de estos mRNAs en vez de su transcripción (Kaelin, 1998). Esta teoría se vio apoyada por la demostración de que VHL forma parte de un complejo E3-ubiquitin ligasa formado por las elonguinas B y C, cullina 2 y la proteína “Ring-box” (Rbx1) (Kamura *et al.*, 1999; Lonergan *et al.*, 1998; Stebbins *et al.*, 1999) (Fig. 2A).

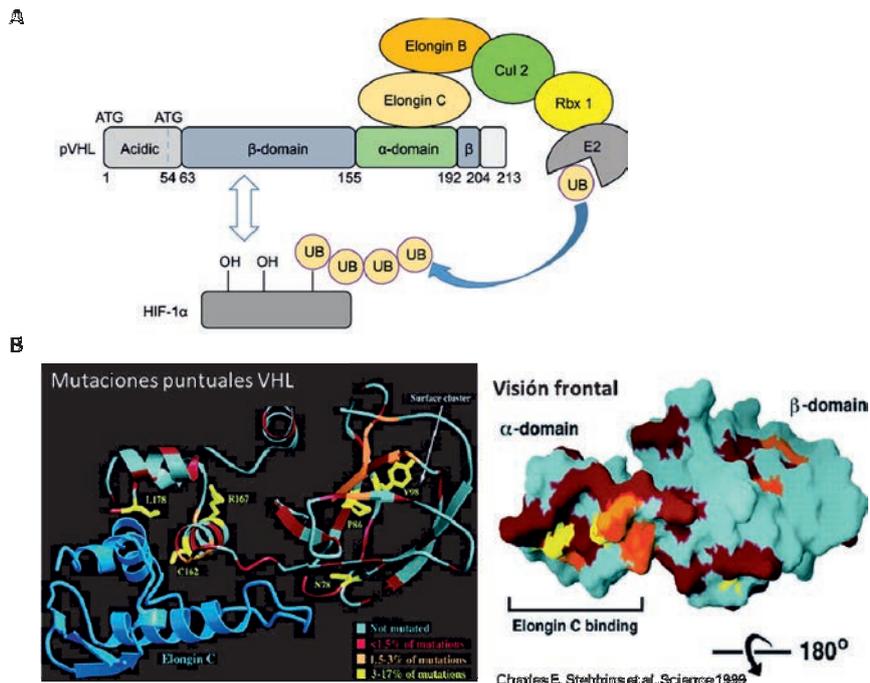


Figura 2. Proteína pVHL y las alteraciones frecuentes que aparecen en tumores. A) adaptado de Aki *et al.*, 2019, B) modificado de Stebbins *et al.*, 1999.

Faltaba entonces por identificar cuál era la diana regulada por este complejo y cuya desregulación resultaba en una predisposición a oncogénesis y progresión tumoral.

### El mecanismo de respuesta al oxígeno: EPO, HIF y VHL

El oxígeno es esencial para la vida animal ya que es usado en la mitocondria para la producción de energía a través del metabolismo aeróbico. Este proceso enzimático fue descrito por Otto Warburg por lo que recibió el Nobel de Medicina en 1931. El oxígeno es transportado a los distintos órganos en la sangre donde está unido a la hemoglobina de manera reversible. Cada órgano tiene un consumo de oxígeno distinto que es proporcional a su índice metabólico (Patinha *et al.*, 2017). A pesar de ser esencial para la vida, los niveles de oxígeno deben ser regulados, ya que tanto su deficiencia (hipoxia) como su exceso (hiperoxia) son dañinos para el organismo. De hecho, patologías como el cáncer, la diabetes, la hipertensión, la enfermedad renal crónica o el infarto presentan niveles deficientes de oxigenación de los tejidos (Patinha *et al.*, 2017). Por ello, durante la evolución se han seleccionado mecanismos que aseguren el adecuado suministro de oxígeno a los distintos órganos. Ya en 1938 se otorgó el Nobel a Corneille Heymans por descubrir cómo el cuerpo carotídeo detecta los niveles de oxígeno en sangre y controla el ritmo respiratorio mediante una señalización directa al cerebro.

Cuando se alcanzan niveles críticos de oxígeno, cualquier incremento en el consumo o disminución en la entrega de oxígeno, lleva a condiciones hipóxicas en el tejido. La hipoxia representa una reducción parcial de oxígeno y desoxigenación del tejido que dispara una serie de respuestas fisiológicas para recuperar los niveles. Además del control adaptativo regulado por el cuerpo carotídeo otros mecanismos moleculares son activados durante la respuesta a hipoxia. En adultos el mecanismo fundamental de esta respuesta adaptativa es el incremento de los niveles de la hormona EPO secretados en adultos por fibroblastos intersticiales de los riñones, y en menor medida por los hepatocitos (Wang y Semenza, 1996). La EPO va al torrente sanguíneo e induce la producción de nuevos glóbulos rojos (eritropoyesis) en la médula ósea encargados de restablecer los niveles de oxígeno en los tejidos (Fig. 3A).

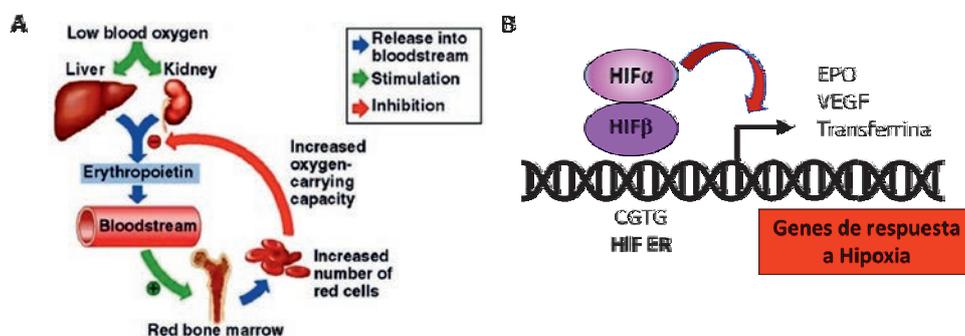


Figura 3. Componentes de la respuesta celular a hipoxia: eritropoyetina y HIF.

En los años 90 los estudios de Gregg Semenza y Sir Peter Ratcliffe elucidaron el mecanismo molecular de la regulación del gen de la EPO en respuesta al oxígeno. Estos trabajos identificaron una región *enhancer* en el promotor de este gen a la que se unía, en respuesta a hipoxia, un factor de transcripción el cual denominó factor de transcripción inducible por hipoxia o HIF1 (Firth *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1996; Wang y Semenza, 1993). HIF1 es el factor de transcripción encargado de activar los genes de respuesta a hipoxia. Como se muestra en la Fig. 3B, HIF1 es un heterodímero constituido por subunidades alfa (HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$ ) y beta (HIF1 $\beta$ ) que se unen a secuencias específicas (elementos de respuesta de HIF, HIF-ER) en los promotores de sus genes diana. Se sabía que mientras que las subunidades beta eran estables, las subunidades alfa eran degradadas rápidamente en presencia de oxígeno, pero se desconocía el mecanismo de esta degradación.

#### La clave final está en el oxígeno

Es en este punto cuando se cruzan estas investigaciones y la pieza de unión del puzzle la encontró Michel Ohh en el laboratorio de William Kaelin, quien a la vez que el grupo del Dr. Ratcliffe, demostró que pVHL, a través de su dominio- $\beta$ , se unía directamente a HIF1 $\alpha$  induciendo su ubiquitinación y así marcándolo para su degradación por el sistema del Proteasoma celular (Fig. 2A) (Cockman *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000). Sin embargo, aún se desconocía la señal que regulaba el reconocimiento y degradación de HIF1 $\alpha$ , ¿Cuál era el sensor del oxígeno? ¿Por qué pVHL degrada a HIF1 $\alpha$  en condiciones de normoxia, pero no en hipoxia?

Unos años después Mirsha Ivan, en el laboratorio de William Kaelin y simultáneamente el grupo del Dr. Ratcliffe, descubrieron que la clave estaba en el oxígeno. Estos investigadores identificaron dos residuos de prolina, altamente conservados en HIF1 $\alpha$ , que eran modificados químicamente por una hidroxilación únicamente en presencia de oxígeno (normoxia) (Ivan *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). Mirsha identificó la enzima que lleva a cabo esta modificación y que funcionaba únicamente en presencia de oxígeno: la 2-oxoglutarato (2OG)-dependiente dioxygenasa denominada EGLN o PDH (*Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein*) (Ivan *et al.*, 2002). Los residuos de prolina hidroxilados en HIF1 $\alpha$  generan sitios de unión de alta afinidad para el complejo VHL-E3 ubiquitin ligasa/EL-B/EL-C/Cul2, que ubiquitará HIF1 $\alpha$  marcándola para su degradación (Fig. 4).

De esta manera, con niveles críticos de oxígeno, PDH no es activa por lo que pVHL no se unirá a HIF1 $\alpha$ , el cual se podrá acumular y unirse a HIF1 $\beta$ , para

transactivar genes diana de respuesta a hipoxia. En consecuencia, se desencadenará la expresión de EPO y la consecuente eritropoyesis, la expresión de factores pro-angiogénicos generándose nuevos vasos sanguíneos y se activará el metabolismo celular (Fig. 4).

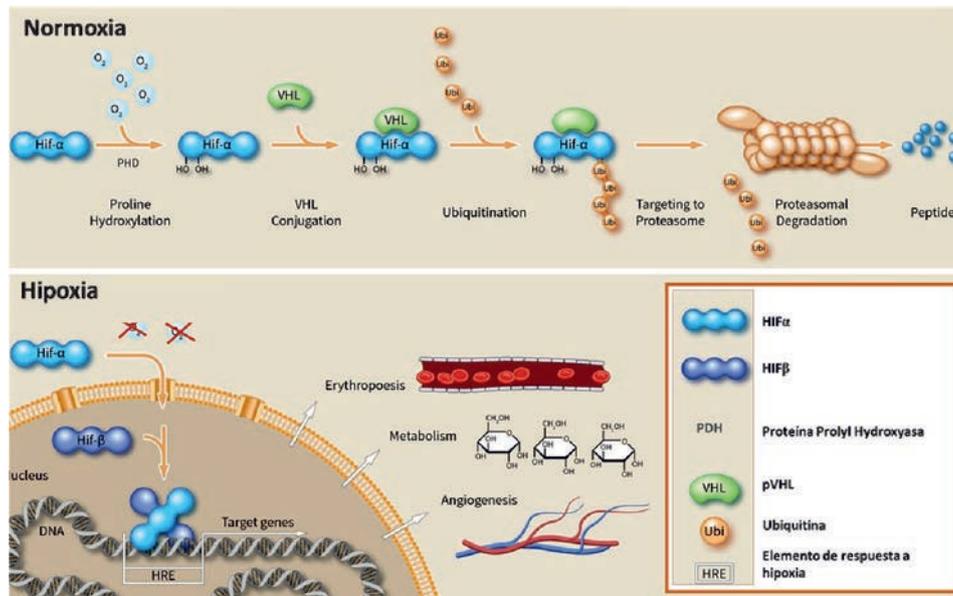


Figura 4. Mecanismo de detección de oxígeno y respuesta celular.

En su conjunto, el trabajo de los tres galardonados ha permitido entender el mecanismo de detección de los niveles de oxígeno y la respuesta adaptativa implicado en múltiples procesos fisiológicos como la regulación del metabolismo, el ejercicio, el desarrollo embrionario o la adaptación a la altura y sienta las bases para entender la desregulación de la detección de oxígeno asociada a diversas patologías (como la anemia, el cáncer, el ictus o el infarto).

### Una celebración y la misión futura

Para el Dr. Kaelin estos estudios son la demostración de que, para que los avances científicos se puedan trasladar a los pacientes es fundamental que los investigadores hagan ciencia básica de calidad, lo cual permitirá comprender en profundidad los mecanismos que gobiernan la fisiología, y por ende la patología, de los procesos que queremos intervenir, en vez de enfocarse en cuestiones “vendibles” o “patentables”. En sus palabras: *“Rather than focusing on timelines, deliverables, and impact, as engineers would, we need to let the scientists be scientists and the engineers be engineers.”*

Fiel a su forma de hacer ciencia, al preguntarle: ¿cuál es tu nuevo objetivo después de este premio? Contesta que se centrará en demostrar que la combinación de múltiples terapias dirigidas puede curar una enfermedad compleja como

el cáncer. Se dedicará a la identificación de fármacos que puedan manipular los mecanismos de respuesta a oxígeno para restaurar la función de pVHL en su ausencia y ser usados en el tratamiento contra esta enfermedad en combinación con otras terapias.

Hace dos años todos los postdoctorales de Bill nos juntamos para celebrar su 60 cumpleaños y los 25 años de su laboratorio. La reunión la llamamos *The Kaelin Legacy*, y pocos nos imaginamos, incluido el Dr. Livingston su antiguo mentor, que ese legado iba a ser el premio Nobel de Medicina (Fig. 5A). Hace dos semanas nos hemos vuelto a juntar para celebrar este premio (Fig. 5B), que, aunque haya sido dado por los descubrimientos en la detección de oxígeno, realmente refleja una trayectoria científica de un largo y fructífero camino hacia el Nobel.



Figura 5. El legado de William Kaelin: Bill Kaelin, David Livingston, parte de su grupo de investigación y la autora.

### Bigliografía

- Adams, P.D. y Kaelin, W.G. 1996. The Cellular Effects of E2F Overexpression. In *Transcriptional Control of Cell Growth: The E2F Gene Family*, P.J. Farnham, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 79-93
- Ashworth, A., Lord, Christopher, J. y Reis-Filho, JorgeS. 2011. Genetic Interactions in Cancer Progression and Treatment. *Cell* 145:30-38
- Bérourd, C., Joly, D., Gallou, C., Staroz, F., Orfanelli, M.T. y Junien, C. 1998. Software and database for the analysis of mutations in the VHL gene. *Nucleic Acids Research* 26:256-258
- Berse, B., Brown, L.F., Van de Water, L., Dvorak, H.F. y Senger, D.R. 1992. Vascular

- permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Molecular Biology of the Cell* 3:211-220
- Chittenden, T., Livingston, D.M. y Kaelin, W.G. 1991. The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* 65:1073-1082
- Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. y Maxwell, P.H. 2000. Hypoxia Inducible Factor- $\alpha$  Binding and Ubiquitylation by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Journal of Biological Chemistry* 275:25733-25741
- Dolgin, E. 2017. DNA's secret weapon against knots and tangles. *Nature* 544: 284-286
- Duan, D.R., Pause, A., Burgess, W.H., Aso, T., Chen, D.Y., Garrett, K.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Linehan, W.M. y Klausner, R.D. 1995. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* 269:1402
- Firth, J.D., Ebert, B.L. y Ratcliffe, P.J. 1995. Hypoxic Regulation of Lactate Dehydrogenase A: INTERACTION BETWEEN HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR 1 AND cAMP RESPONSE ELEMENTS. *Journal of Biological Chemistry* 270:21021-21027
- Flemington, E.K., Speck, S.H. y Kaelin, W.G. 1993. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:6914
- Gnarra, J.R., Zhou, S., Merrill, M.J., Wagner, J.R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E.H., Klausner, R.D. y Linehan, W.M. 1996. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:10589-10594
- Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S. y Kaelin, W.G. 1995. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nature Medicine* 1:822-826
- Iliopoulos, O., Levy, A.P., Jiang, C., Kaelin, W.G., Jr. y Goldberg, M.A. 1996. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93:10595-10599
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., *et al.* 2000. Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407:645-648
- Irwin, M.S., Kondo, K., Marin, M.C., Cheng, L.S., Hahn, W.C., y Kaelin, W.G. 2003. Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 3:403-410
- Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D.C., Michelson, K.S., Günzler, V., Kondo, K., Yang, H., Sorokina, I., Conaway, R.C., Conaway, J.W., *et al.* 2002. Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:13459-13464

- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. y Kaelin Jr, W.G. 2001. HIF $\alpha$  Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O<sub>2</sub> Sensing. *Science* 292,464
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.-M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A.v., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., *et al.* 2001. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O<sub>2</sub>-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* 292, 468
- iang, B.-H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., y Semenza, G.L. 1996. Dimerization, DNA Binding, and Transactivation Properties of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 271:17771-17778
- Jost, C.A., Marin, M.C. y Jr, W.G.K. 1997. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389:191-194
- Kaelin Jr, W.G. 1997. Alterations in G1/S Cell-Cycle Control Contributing to Carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 833:29-33
- Kaelin, J.W.G. 2003. E2F1 as a Target: Promoter-Driven Suicide and Small Molecule Modulators. *Cancer Biology & Therapy* 2:47-53
- Kaelin, W.G. 1998. Another p53 Doppelgänger? *Science* 281:57
- Kaelin, W.G. 2007. von Hippel-Lindau Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2:145-173
- Kaelin, W.G., Ewen, M.E. y Livingston, D.M. 1990. Definition of the minimal simian virus 40 large T antigen- and adenovirus E1A-binding domain in the retinoblastoma gene product. *Molecular and Cellular Biology* 10:3761
- Kaelin, W.G., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blunar, M.A., *et al.* 1992. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 70:351-364
- Kaelin, W.G., Pallas, D.C., DeCaprio, J.A., Kaye, F.J. y Livingston, D.M. 1991. Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/EA-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64:521-532
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.-C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.-M., Dumont, X., *et al.* 1997. Monoallelically Expressed Gene Related to p53 at 1p36, a Region Frequently Deleted in Neuroblastoma and Other Human Cancers. *Cell* 90:809-819
- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Elledge, S.J., Conaway, R.C., *et al.* 1999. Rbx1, a Component of the VHL Tumor Suppressor Complex and SCF Ubiquitin Ligase. *Science* 284:657
- Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J.A. y Kaelin, W.G. 1995. Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 269:1444
- Kim, W.Y. y Kaelin, W.G. 2004. Role of VHL Gene Mutation in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 22:4991-5004

- Lane, D.P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16
- Lonergan, K.M., Iliopoulos, O., Ohh, M., Kamura, T., Conaway, R.C., Conaway, J.W. y Kaelin, W.G. 1998. Regulation of Hypoxia-Inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Requires Binding to Complexes Containing Elongins B/C and Cul2. *Molecular and Cellular Biology* 18:732
- Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O'Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., et al. 2000. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nature Genetics* 25:47-54
- Marin, M.C., Jost, C.A., Irwin, M.S., DeCaprio, J.A., Caput, D. y Kaelin, W.G., Jr. 1998. Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Molecular and cellular biology* 18:6316-6324
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. y Ratcliffe, P.J. 2001. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO Journal* 20:5197-5206
- Ohh, M., Park, C., Ivan, M., Hoffman, M., Kim, T.Y., Huang, L., Pavletich, N., Chau, V. y Kaelin, W. 2000. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the  $\beta$ -domain of the von Hippel Lindau protein. *Nature cell biology* 2:423-427
- Ohh, M., Yauch, R.L., Lonergan, K.M., Whaley, J.M., Stemmer-Rachamimov, A.O., Louis, D.N., Gavin, B.J., Kley, N., Kaelin, W.G. e Iliopoulos, O. 1998. The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Is Required for Proper Assembly of an Extracellular Fibronectin Matrix. *Molecular Cell* 1:959-968
- Patinha, D., Pijacka, W., Paton, J.F.R. y Koeners, M.P. 2017. Cooperative Oxygen Sensing by the Kidney and Carotid Body in Blood Pressure Control. *Frontiers in Physiology* 8:752
- Qin, X.Q., Livingston, D.M., Kaelin, W.G. y Adams, P.D. 1994. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:10918
- Shen, C. y Kaelin, W.G. 2013. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Seminars in Cancer Biology* 23:18-25
- Siemeister, G., Weindel, K., Mohrs, K., Barleon, B., Martiny-Baron, G. y Marmé, D. 1996. Reversion of Deregulated Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Renal Carcinoma Cells by von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *Cancer Research* 56:2299
- Stebbins, C.E., Kaelin, W.G. y Pavletich, N.P. 1999. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB Complex: Implications for VHL Tumor Suppressor Function. *Science* 284, 455
- Varshney, N., Kebede, A.A., Owusu-Dapaah, H., Lather, J., Kaushik, M. y Bhullar, J.S. 2017. A Review of Von Hippel-Lindau Syndrome. *Journal of Kidney Cancer VHL* 4:20-29
- Wang, G.L. y Semenza, G.L. 1993. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and



regulation of DNA binding activity by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 268:21513-21518

Wang, G.L. y Semenza, G.L. 1996. Molecular basis of hypoxia-induced erythropoietin expression. *Current Opinion in Hematology* 3

Wizigmann-Voos, S., Breier, G., Risau, W. y Plate, K. 1995. Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in von Hippel-Lindau Disease-associated and Sporadic Hemangioblastomas. *Cancer Research* 55:1358-1364

Yu, F., White, S.B., Zhao, Q. y Lee, F.S. 2001. HIF-1 $\alpha$  binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:9630

## Fitosociología, Fitoclimatología y Fitogeografía: Tres ciencias en un mismo camino

Ángel Penas, Sara del Río

Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental (Área de Botánica). Instituto de Ganadería de Montaña (Centro Mixto CSIC-ULE). Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 24071. León

### Resumen

En este trabajo abordamos el estudio e interrelación de tres ciencias: la Fitosociología, que profundiza en el conocimiento de la flora vascular analizando la formación de comunidades vegetales y su relación con el medio, así como estableciendo su carácter climácico, sucesional o antrópico y sus relaciones dinámico-catenales; la Fitoclimatología, que nos ayuda a definir las condiciones climáticas en las que se desarrollan dichas biocenosis y a establecer los umbrales numéricos que delimitan su existencia y, por último; la Fitogeografía, que nos permite delimitar las áreas geográficas de la distribución terrestre de las mismas. Estas ciencias tienen un método científico interdependiente que puede considerarse un todo unitario (camino) para las tres.

**Palabras clave:** Fitosociología, Fitoclimatología, Fitogeografía, Geobotánica global, Medio Terrestre.

Que tres ciencias experimentales hayan encontrado, fundamentándose la una en la otra, la posibilidad de establecer una relación entre ellas, es algo poco frecuente.

Este hecho se produce en el día de hoy, y más aún se producirá en años venideros, entre las ciencias conocidas como Fitosociología, Bioclimatología y Biogeografía, o mejor, para mayor precisión, entre la Fitosociología, la Fitoclimatología y la Fitogeografía.

Ajustándonos a esta afirmación podríamos concluir, como ejemplo, que los sabinares albares pertenecientes a la asociación *Juniperetum sabino-orocantabricae* (Fitosociología) están en los territorios Picoeuropeo-Ubiñenses (Fitogeografía) y que se desarrollan en un bioclima Templado oceánico submediterráneo (Fitoclimatología).

Pero si en este caso llegamos a la conclusión precedente, partiendo ahora de un tipo de vegetación potencial en principio desconocido (Fitosociología), si nos encontráramos en los territorios del Distrito Babiano-Toriano (Sector Picoeuropeo-Ubiñense) (Fitogeografía), podríamos deducir al ver un sabinar al-

Forma de mencionar este artículo: Penas, A., del Río, S. 2019, Fitosociología, Fitoclimatología y Fitogeografía: Tres ciencias en un mismo camino. *AmbioCiencias*, 17, 72-86. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

bar que este pertenecería a la asociación ya mencionada y que las condiciones fitoclimáticas en las que se desarrolla serán las de un bioclima Templado oceánico submediterráneo, incluso más concretamente en un termotipo supratemplado y un ombrotipo subhúmedo-húmedo (Fitoclimatología).

Obviamente, si lo que conocemos es la Fitoclimatología y la vegetación que se desarrolla es un sabinar albar de la asociación mencionada con anterioridad, podremos concluir que los territorios en los que nos encontramos pertenecen a la Región Eurosiberiana, Subregión Atlántica Centroeuropea, Provincia Atlántica Europea, Subprovincia Orocantábrica, Sector Picoeuropeo-Ubiñense, Distrito Babiano-Toriano.

Esta realidad actual y este carácter predictivo es un hecho probado científicamente y de carácter universal, y ello ha sido posible gracias a los avances que en los últimos 50 años han experimentado las tres ciencias mencionadas y la relación establecida entre ellas. Ello nos lleva al final a integrarlas en una única ciencia que conocemos como Geobotánica Global.

Pero vayamos por partes.

Primero definamos qué entendemos por Geobotánica Global y por tal entendemos la ciencia que trata de establecer macro y micromodelos basados en datos florísticos, corionómicos, vegetacionales, bioclimáticos, biogeográficos y funcionales, que tengan información relevante, capacidad de predicción y facilidad de uso. El adjetivo global en el término también alude a que su jurisdicción es la geobiosfera, espacio aéreo y ambiente común de los ecosistemas terrestres, poblados, regidos y definidos esencialmente por las plantas vasculares, desde su aparición en el Paleozoico y que a su vez son función de la evolución y portadoras en sus corias de una precisa información geobotánica. Se ha denominado también Geobotánica integradora.

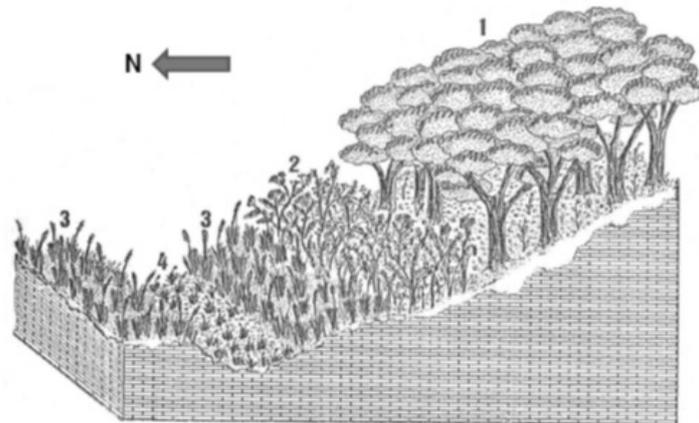
Como vemos, de la definición se desprende que incluye las tres ciencias a las que nos estamos refiriendo desde un principio (Fitosociología, Fitoclimatología y Fitogeografía), si bien hace uso de otras imprescindibles también para el buen desarrollo de las mismas, partiendo de la Taxonomía y pasando por la Geología, Edafología, Litología, Geografía Física, etc.

Por su parte, la Fitosociología es la ciencia que estudia las comunidades vegetales y sus relaciones con el medio, al tiempo que intenta clasificar y ordenar las comunidades en un sistema jerárquico (Sintaxonomía). Es, por tanto, la ciencia de los sintáxones, en la que la asociación vegetal es su unidad fundamental. Se han utilizado como sinónimos los términos Sociología Vegetal, Fitocenología y Sinecología Vegetal.

Esta ciencia estudia las biocenosis desde una perspectiva botánica (fitoce-

nosis), es decir, se ocupa de las comunidades vegetales, de sus relaciones con el medio y de los procesos temporales que las modifican. Con toda esta información, a través de un método inductivo y estadístico basado en el inventario de vegetación, trata de crear una tipología jerárquica universal en la que la asociación es la unidad básica del sistema tipológico.

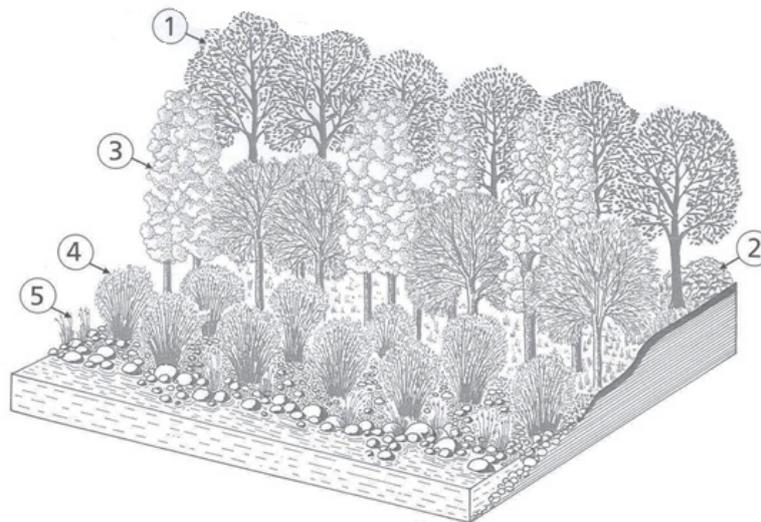
Hoy se distingue, además de la Fitosociología clásica o braunblanquetista (ciencia de las comunidades vegetales o sintáxones), la Fitosociología dinámico-catenal, global o paisajista, en la que sus unidades fundamentales son: en la dinámica, la serie o *sigmetum* (**Fig. 1**) y la permaserie o *permasigmetum* (**Fig. 2**); y en la catenal, la geoserie o *geosigmetum* (**Fig. 3**) y la geopermaserie o *geopermasigmetum* (**Fig. 4**).



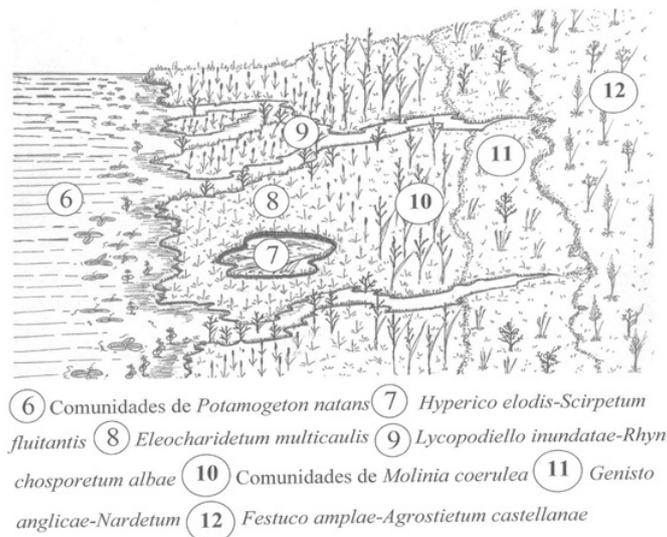
**Figura 1.** Representación gráfica de una serie de vegetación (clímax: 1. *Epipactido helleborines-Fagetum sylavaticae* y sus etapas de sustitución; 2. Matorral de *Pruno spinosae-Berberidetum cantabricae*; 3. Matorral camefítico de *Glandoro diffusae-Genistetum occidentalis*; y 4. Pastizal vivaz de *Helianthemo cantabrici-Brometum erecti*) (Autor: T.E. Díaz).



**Figura 2.** Permaserie de vegetación rupícola de *Petrocoptidetum glaucifoliae* (Autor: S. del Río).



**Figura 3.** Representación gráfica de una geoserie riparia formada por tres series de vegetación dispuestas catenalmente en relación a su proximidad al río (1. Olmedas o Alamedas; 2. Sebes; 3. Choperas-saucedas; 4. Saucedas arbustivas; y 5. Comunidades de gujarrales de río) (Autor: T.E. Díaz).



**Figura 4.** Representación gráfica de una geopermaserie lacustre (Autor: T.E. Díaz).

Parece conveniente distinguir en la Fitosociología dinámico-catenal entre la geoserial, con etapas de sustitución vivaces y anuales y la geopermaserial, sin comunidades vivaces de sustitución no nitrófilas. La primera versaría sobre las geoserias de vegetación, las catenas de teselas y los complejos teselares (**Fig. 5**); la segunda, geopermaserial, se ocuparía de las geopermaseries, las catenas de permateselas y los complejos permateselares (**Fig. 5**).



**Figura 5.** Conjunto de series de vegetación, catenas teselares y complejos teselares de vegetación (parte inferior de la fotografía) y geopermaseries, catenas permatesesales y complejos permatesesales (parte superior) en los Picos de Europa (Autor: S. del Río).

En cuanto a la Biogeografía, podemos decir que es la ciencia que estudia la distribución de las especies y de las biocenosis sobre la Tierra. También, teniendo en cuenta las áreas de táxones y sintáxones (Corología vegetal), así como información procedente de otras ciencias de la Naturaleza (Geografía, Edafología, Bioclimatología, Geología, etc.), trata de establecer una tipología jerárquica de los territorios del planeta, cuyas unidades en orden decreciente son: reino, región, provincia, sector, distrito, comarca, célula de paisaje y tesela.

Tal sistematización es uno de los objetivos científicos principales de la Geobotánica actual. La Biogeografía se puede denominar también Fitogeografía, dada la importancia de las especies y comunidades de plantas en la definición y delimitación de sus unidades tipológicas terrestres. La unidad elemental o de menor rango de la Biogeografía es la tesela, que definimos como un espacio geográfico de mayor o menor extensión, homogéneo ecológicamente; es decir, que sólo puede poseer un tipo de vegetación potencial y, en consecuencia, una única secuencia de comunidades sustituyentes. La tesela, la permatesela y sus complejos teselares y permateselares fruto de la geomorfología local, son las únicas unidades biogeográficas que pueden repetirse de modo disyunto. Un amplio espacio geográfico caracterizado por un conjunto de teselas o permateselas y de sus correspondientes complejos, ensambladas por redes de geosigmetos y geopermasigmetos en función del relieve o de los suelos del territorio, constituyen el elemento de paisaje; ej.: penillanuras en horst, valles fluviales, conjuntos lagunares, deltas, altas montañas, etc. La comarca biogeográfica, que también ha si-

do denominada “mosaico local” (Bolòs, 1963) y “Wuchsdistrict” (Schmithüsen, 1959), debe ser un amplio territorio bien delimitado geográficamente, que posea un conjunto de especies, asociaciones y, sobre todo, geosigmetos topográficos peculiares; ej.: La Sagra Toledana, la Hoya del Bierzo, la Tierra de Barros, etc. El distrito es un conjunto de amplias comarcas biogeográficas, caracterizado por la existencia de una flora particular con especies diferenciales obvias, incluso endémicas en los costeros u oreinos, que permitan su separación de los distritos adyacentes; así como, por un conjunto de asociaciones, series y geoserias cliseriales propias, que faltan en los distritos próximos. En muchos casos, su amplitud y jurisdicción corresponde a la de los antiguos subsectores. El sector es un conjunto de distritos de gran entidad geográfica, que posee táxones, asociaciones y series de vegetación propias; así como que muestra geoserias topográficas y geoclinosecuenciales originales que, en general, suelen deberse a la existencia de comunidades climatófilas permanentes y subseriales endémicas. La provincia es un vasto territorio que, además de poseer gran número de endemismos o subelemento propio, tiene unas particulares macroseries y geomacroseries. También es característico de cada provincia una peculiar zonación altitudinal de la vegetación. La región es un territorio muy extenso que posee una flora o elemento florístico original en el que existen especies, géneros o incluso familias endémicas; asimismo, dispone de megaserias y geomegaserias particulares y, en consecuencia, pisos bioclimáticos propios. Por último, el reino es la unidad suprema de la Biogeografía y en él, además de consideraciones taxonómicas y ecosistemáticas, entra en juego el origen de la flora y fauna, la formación de los grandes continentes, el clima, los paleoclimas, etc.

Como ya es tradicional en esta ciencia, las denominaciones de las unidades biogeográficas se acuñan como gentilicios en base a nombres geográficos conocidos, que se estima son más o menos coincidentes, informativos o representativos del área que trata de expresar. Ortográficamente, todas las unidades biogeográficas se consideran nombres propios de lugar. Si el nombre se forma por yuxtaposición de dos nombres geográficos, estos se unen por un guion, manteniendo las mayúsculas por su condición de nombre propio. Parece conveniente recordar que sólo a través de su diagnosis y de los correspondientes mapas se pueden delimitar con precisión los territorios biogeográficos (**Fig. 6**).

Todas las unidades biogeográficas, excepto la tesela y permatesela, deben ser territorios contiguos por vía terrestre o marina que incluyan los accidentes orográficos y diversidad litológica que pueda existir en su área. A veces, en los territorios biogeográficos de entidad, aparecen introgresiones de otras adyacentes y, en ocasiones, tales islas pueden llegar a ser frecuentes en comarcas de li-

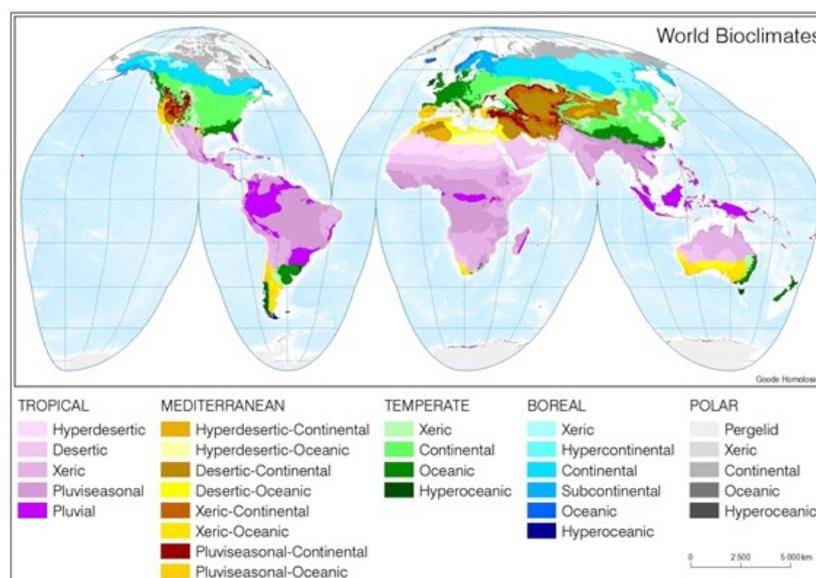


**Figura 6.** Mapa fitogeográfico de la Península Ibérica e Islas Baleares a nivel subprovincial (Rivas-Martínez *et al.*, 2017).

tología variada o en áreas próximas a fronteras regionales o provinciales. Su posible independencia tipológica, siempre de rango inferior a aquella en la que se integre, depende de su originalidad, riqueza florística y fitocenótica, así como de su extensión superficial. Uno de los criterios tradicionalmente utilizados en el reconocimiento y delimitación de áreas biogeográficas de entidad propia es el discernimiento y cartografía de aquellos táxones (familias, géneros, especies y subespecies) que tienen una distribución territorial ceñida a un área concreta. A tales táxones se les ha llamado endemismos. Ventajosamente, los endemismos se han utilizado en la definición y delimitación de las unidades corológicas o biogeográficas (provincias, sectores) al formar parte del subelemento fitogeográfico que las caracteriza. Asimismo, los endemismos (táxones o sintáxones) de mayor área o regionales, y los existentes por razones migratorias dispersos en varias regiones biogeográficas, constituyen el elemento o geoelemento fitogeográfico. En los tiempos actuales, con el desarrollo de la Fitosociología dinámico-catenal y el conocimiento sintaxonómico, bioclimático, edáfico y cartográfico de amplios territorios de la Tierra, las series y geoseries de vegetación han pasado a ser criterios esenciales sobre todo en la delimitación y definición de las unidades biogeográficas (**Fig. 6**).

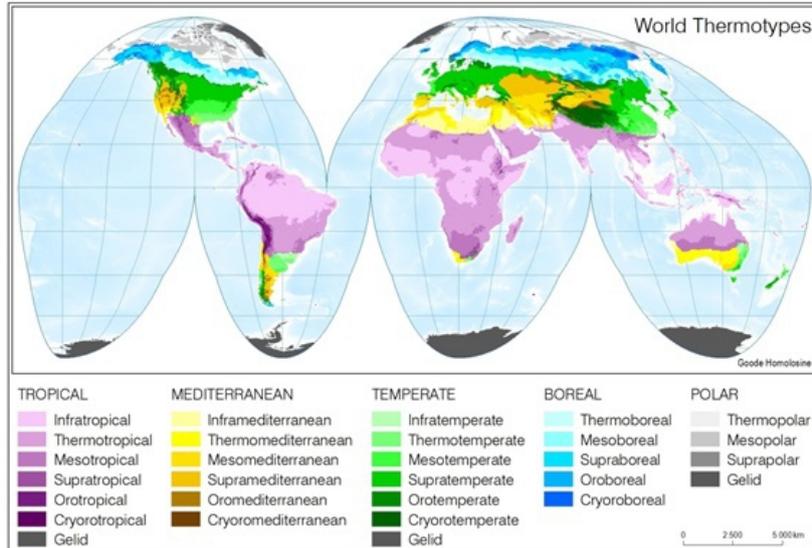
Por último, hablaremos de la Fitoclimatología, que estudia la reciprocidad entre el clima y la distribución de los seres vivos y de sus comunidades en la Tierra. Esta disciplina comenzó a estructurarse a partir de la relación de los valo-

res numéricos del clima (temperatura y precipitación) con los areales de las plantas y las formaciones vegetales, para añadir más adelante información de las biogeocenosis y recientemente conocimientos de la Fitosociología dinámico-catenal, es decir, de los sigmetos, geosigmetos y geopermasigmetos (series, geoseries y geopermaseries de vegetación). En los últimos años el Prof. Rivas-Martínez ha tratado de poner a punto una clasificación bioclimática de la Tierra que tenga jurisdicción en toda la geobiosfera. Las razones del empeño son llegar a disponer de una tipología bioclimática fácilmente cuantificable que muestre una relación ajustada entre los componentes vegetacionales y los valores del clima, al tiempo que, habida cuenta del elevado valor predictivo de las unidades bioclimáticas, puedan utilizarse en otras ciencias, en los programas de estudio y conservación de la biodiversidad, así como en la obtención de recursos agrícolas y forestales. El conocimiento cada vez más detallado de la distribución de la vegetación sobre la Tierra, así como las modificaciones en el aspecto y composición de la vegetación potencial y de sus etapas de sustitución causadas por factores climáticos, edáficos, geográficos y antrópicos, está permitiendo que cada día puedan reconocerse con mayor precisión y objetividad las fronteras bioclimáticas y vegetacionales. Una vez conocidos y cartografiados los límites o fronteras de las series, geoseries y geopermaseries de vegetación, se han podido calcular los valores bioclimáticos numéricos umbrales que los discriminan (Rivas-Martínez *et al.* 2011). De este modo, progresivamente se han ido delimitando y ajustando los espacios correspondientes a las unidades bioclimáticas (bioclimas, termotipos y ombrotipos). Los modelos biofísicos así establecidos han demostrado tener una elevada reciprocidad en el binomio clima-vegetación, lo que está permitiendo realizar mapas bioclimáticos y biogeográficos mundiales bastante más precisos (**Fig. 7,**

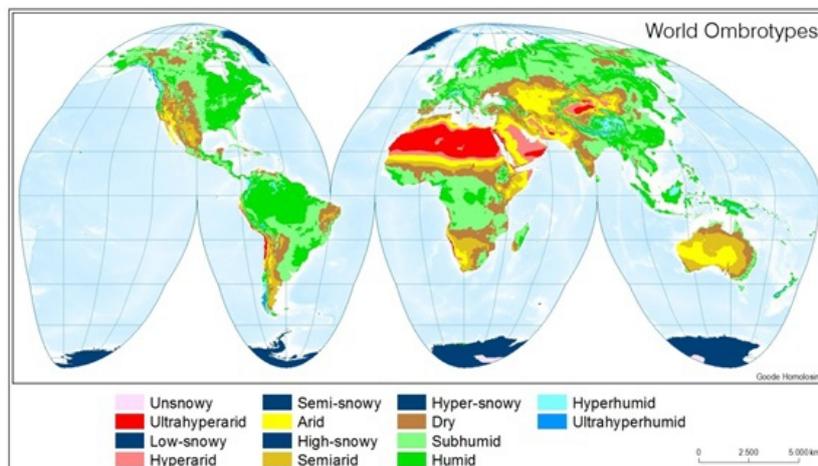


**Figura 7.** Mapa de Bioclimas de la Tierra (Rivas-Martínez *et al.*, 2011).

**8, 9 y 10).** Una consecuencia práctica es haber conseguido un valor predictivo recíproco en toda la Tierra, solamente conociendo los datos del clima o recíprocamente los tipos de vegetación.

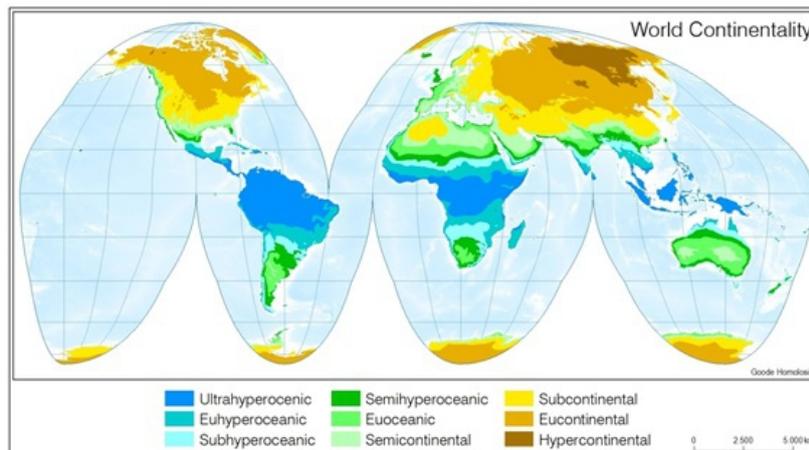


**Figura 8.** Mapa de Termotipos de la Tierra (Rivas-Martínez *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Mapa de Ombrotipos de la Tierra (Rivas-Martínez *et al.*, 2011).

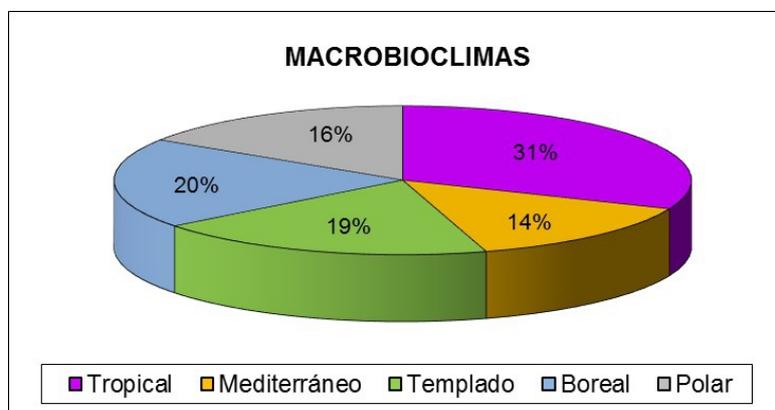
En la clasificación bioclimática global que utilizamos se reconocen cinco macrobioclimas, veintiocho bioclimas y once variantes bioclimáticas. El macrobioclima es la unidad tipológica suprema del sistema de clasificación bioclimática. Se trata de un modelo biofísico ecléctico, delimitado por determinados valores climáticos y vegetacionales, que posee una amplia jurisdicción territorial y que está relacionado con los grandes tipos de climas, de biomas y de regiones biogeográficas que se admiten en la Tierra. Hay cinco macrobioclimas: Tropical,



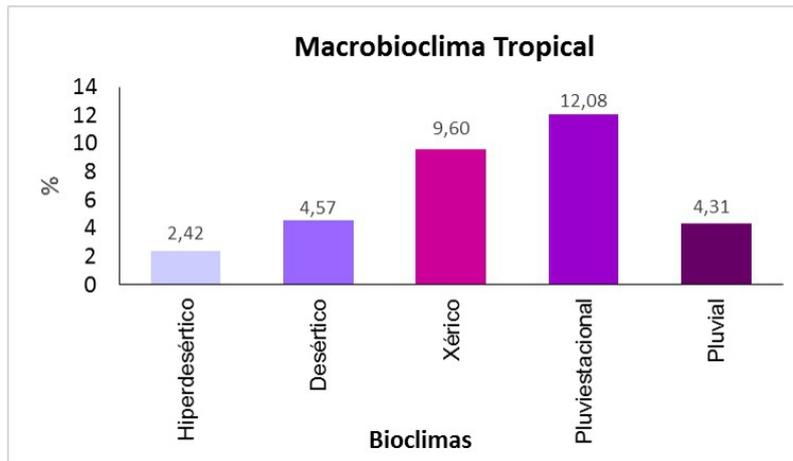
**Figura 10.** Mapa de tipos de Continentialidad de la Tierra (Rivas-Martínez *et al.*, 2011).

Mediterráneo, Templado, Boreal y Polar. Cada uno de ellos y cada una de sus veintiocho respectivas unidades subordinadas o bioclimas, están representados por un conjunto de formaciones vegetales, biocenosis y comunidades vegetales propias. En los bioclimas, además de sus variaciones ombro-termoclimáticas o pisos bioclimáticos: termotipos y ombrotipos, se ha reconocido en función de los ritmos estacionales de la precipitación un cierto número de unidades que se han denominado variantes bioclimáticas.

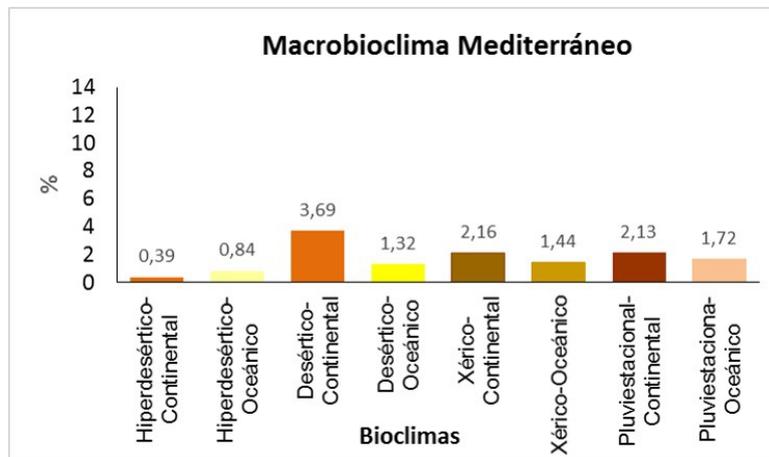
Sin entrar en su conocimiento pormenorizado, podemos señalar aquí cuál es el reparto de la superficie terrestre entre los cinco macrobioclimas (**Fig. 11**) reconocidos y ya mencionados, así como la proporción que en cada uno de ellos se corresponde con los diferentes bioclimas existentes en su seno (**Fig. 12, 13, 14, 15 y 16**). También se presentan los distintos termotipos (**Fig. 17, 18, 19, 20 y 21**) y ombrotipos/quionotipos (**Fig. 22**) de cada macrobioclima a nivel mundial. Por último, se muestran los niveles de continentialidad existentes en la superficie terrestre (**Fig. 23**).



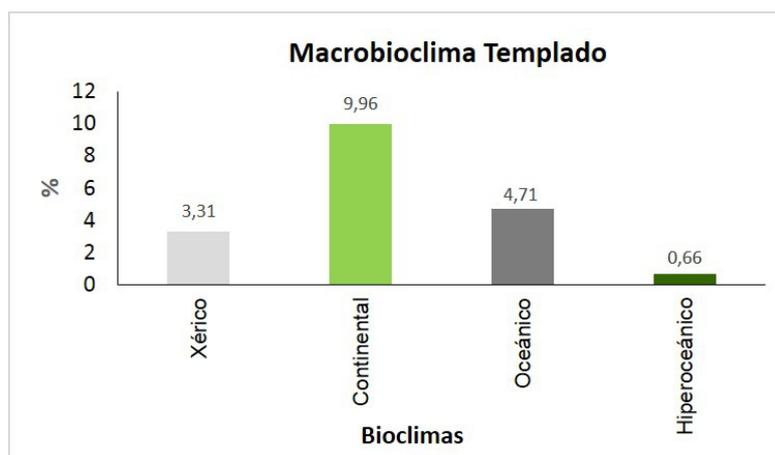
**Figura 11.** Distribución porcentual de los Macrobioclimas.



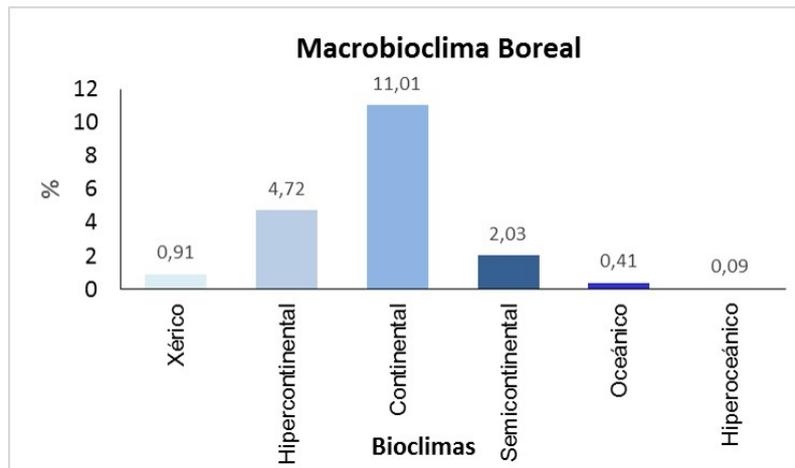
**Figura 12.** Distribución porcentual de los Bioclimas Tropicales.



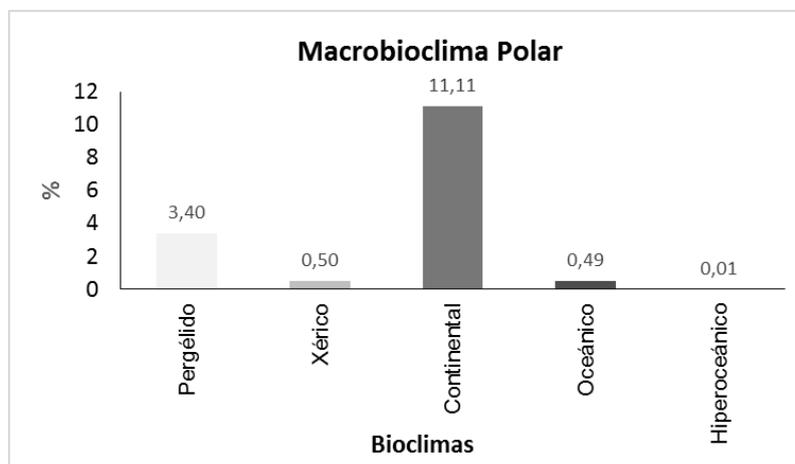
**Figura 13.** Distribución porcentual de los Bioclimas Mediterráneos.



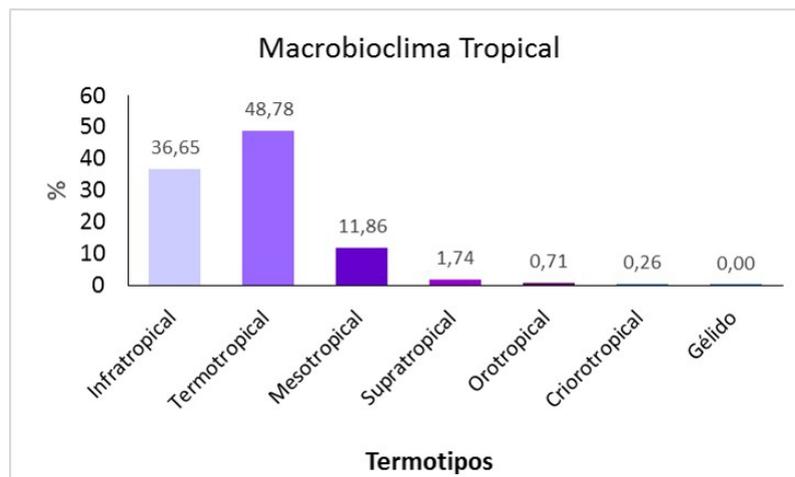
**Figura 14.** Distribución porcentual de los Bioclimas Templados.



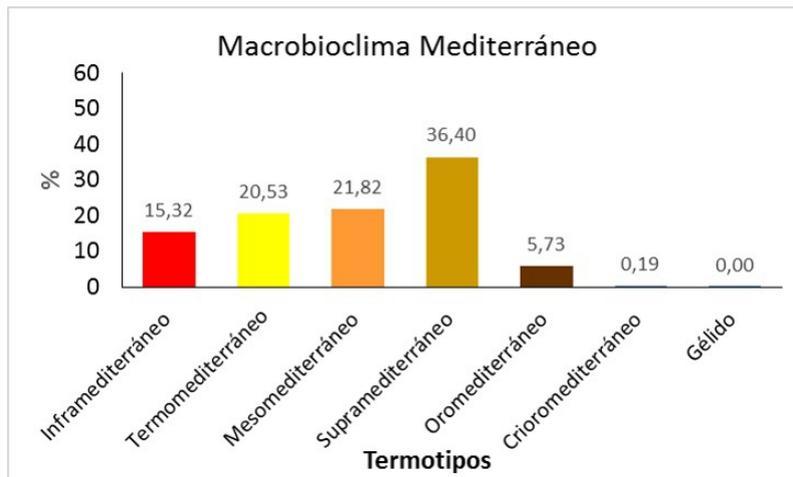
**Figura 15.** Distribución porcentual de los Bioclimas Boreales.



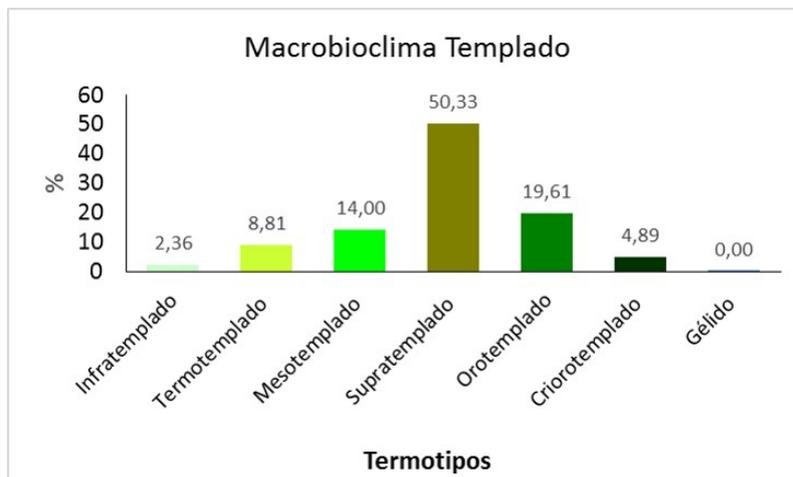
**Figura 16.** Distribución porcentual de los Bioclimas Polares.



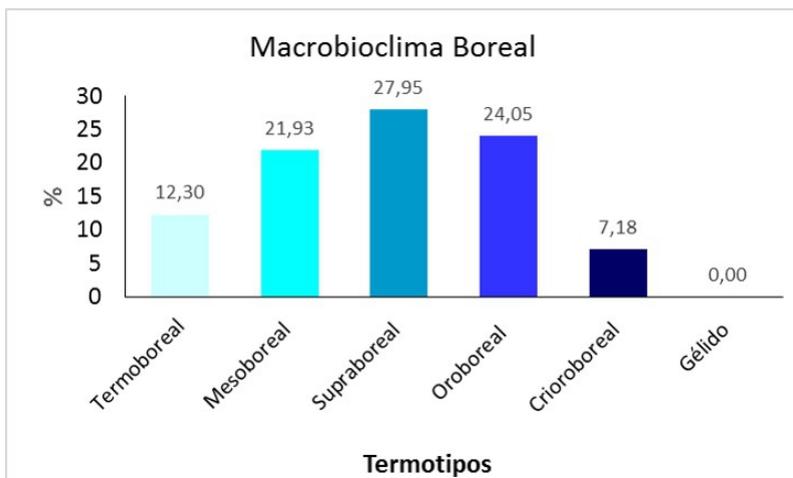
**Figura 17.** Distribución porcentual de los Termotipos Tropicales.



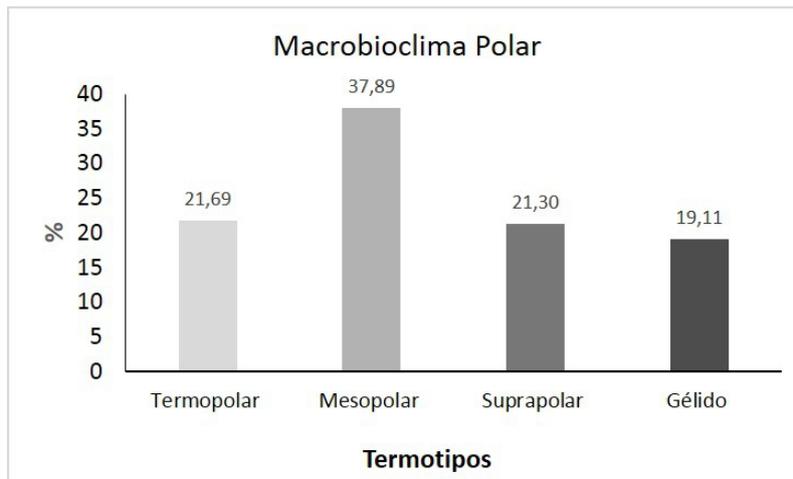
**Figura 18.** Distribución porcentual de los Termotipos Mediterráneos.



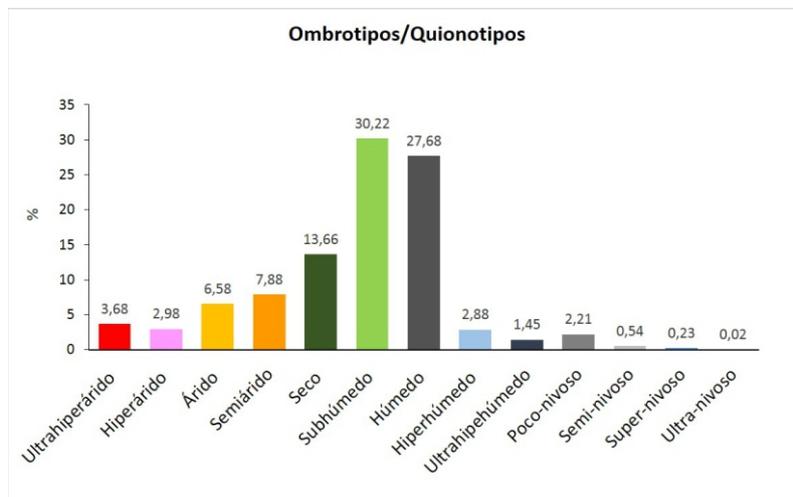
**Figura 19.** Distribución porcentual de los Termotipos Templados.



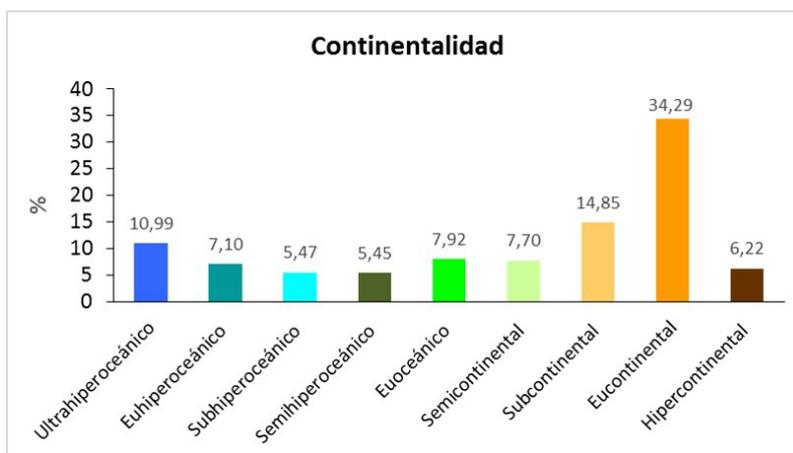
**Figura 20.** Distribución porcentual de los Termotipos Boreales.



**Figura 21.** Distribución porcentual de los Termotipos Polares.



**Figura 22.** Distribución porcentual de los Ombrotipos.



**Figura 23.** Distribución porcentual de los Tipos de Continentalidad.

## **Bibliografía**

- Bolòs, O. 1963. Botánica y Geografía. *Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona* 34:443-480
- Rivas-Martínez, S., Rivas-Sáenz, S. y Penas, A. 2011. Worldwide bioclimatic classification system. *Global Geobotany* 1: 1-634 + 4 maps
- Rivas-Martínez, S., Penas, A., Díaz-González, T.E., Cantó, P., del Río, S., Costa, J.C., Herrero, L. & Molero, J. 2017. Biogeographic Units of the Iberian Peninsula and Balearic Islands to District Level. A Concise Synopsis. In: Loidi J. (eds) *The Vegetation of the Iberian Peninsula. Plant and Vegetation*, vol 12, pp 131-188. Springer
- Schmithüsen, J. 1959. *Allgemeine Vegetationsgeographie*. Berlin

## UNO DE LOS NUESTROS

### Margalef: el último naturalista

Estanislao Luis Calabuig

Catedrático de Ecología jubilado. Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental. Universidad de León.

*“Hablar de Ecología es hablar de Margalef,  
pero hablar de Margalef es mucho más que hablar de Ecología”*  
Josefina Castellví

No resulta frecuente encontrar científicos con acreditada capacidad de excelencia y, al mismo tiempo, que hayan consolidado un cuerpo de doctrina significativo en su área de conocimiento, además de ostentar una completa formación humanística. El profesor Ramón Margalef ha cumplido sobradamente con ambos requisitos, demostrando al mismo tiempo gran eficacia y eficiencia, sirviendo como referencia a la generación de ecólogos del cambio de siglo. Sus planteamientos siempre han asombrado a sus compañeros de profesión, al ser capaz de anticiparse en muchos de los conceptos básicos de la ciencia de los ecosistemas, matizándose a sí mismo, incluso cuando los demás aceptaban algunas de sus propuestas como fundamento de una teoría ecosistémica (Prat 2015 a). Y todo ello en base a la observación de la naturaleza como motor de la creatividad y, como decía el, con cierta dosis de provocación a la polémica (Margalef, 1974). Hay que apostillar que ninguna ciencia es estática y, en este caso, ha sido un excelente dinamizador, tanto en la investigación, como autor propio o director, o como trasmisor de los conocimientos, ya sea en niveles avanzados o en la faceta de divulgación. Rebosaba en la humildad que caracteriza a los genios y siempre tenía una frase sencilla para explicar la complejidad del funcionamiento de la naturaleza. En esta línea quizá sea adecuado aquí contar una anécdota en la que yo mismo participé como uno de sus interlocutores, y que supongo habrá repetido otras veces a diferentes compañeros o alumnos. Tomando un café en el descanso de uno de nuestros congresos, con esa naturalidad y enorme amabilidad que le caracterizaba, la sonrisa casi permanente y la mirada entre afable y pícaro (Fig. 1), después de comentar algunas de las tendencias de mayor actualidad y polémica que en aquel momento rondaban por la cabeza de la comunidad de ecó-

Forma de mencionar este artículo: Luis Calabuig, E. 2019, Margalef: el último naturalista. AmbioCiencias, 17, 87-99. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

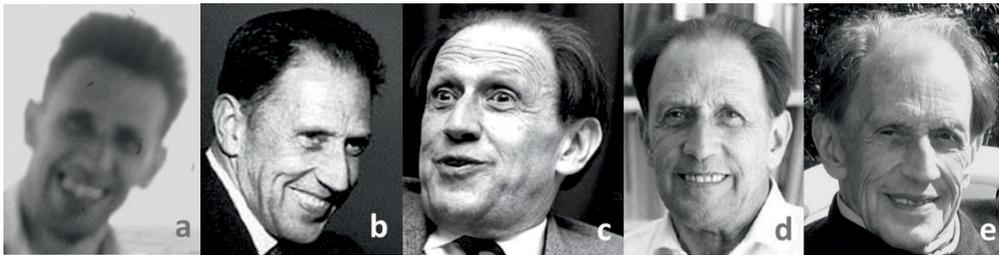


Figura 1. La mirada de Prof. Margalef siempre ha transmitido sencillez y afabilidad. (Fotos: a y e tomadas de Peters, 2010; b de pw 6; c de Ros, 2019; y d de pw 3).

logos, nos dice: *“las cosas son porque pueden ser, porque si no pudieran ser no serían”*. Simplemente eso, encontrar la explicación a las cosas que ocurren en la naturaleza. Parece una nimiedad, pero el fondo de esa aseveración lleva ocupando a la humanidad desde que fue consciente para hacerse preguntas, y seguimos en ello, y seguirá.

Ramón Margalef López, nació en Barcelona en el año 1919. Sus padres habían vivido de la agricultura en la región del Priorato hasta que la filoxera arruinó sus vides y su forma de vida, trasladándose a la capital catalana. Ingresó en una Escuela de Comercio en 1933, pero su curiosidad e interés terminaban siempre en aficiones naturalistas, dibujando y describiendo especies, inscribiéndose y participando en la Institución Catalana de Historia Natural.

Cuando Margalef contaba con 17 años estalló la Guerra Civil, pero permaneció totalmente desinteresado por los temas políticos, radicalmente polarizados en aquellos momentos, y se fue involucrando cada vez más en los estudios naturalistas, llegando incluso a crear algunas revistas científicas. Fue reclutado por el ejército republicano en 1938, pero aprovechaba todo lo posible para seguir con su verdadera afición. Inmediatamente después de concluir la guerra fue reclutado, en esta ocasión por el ejército nacionalista, pero eximido poco después por razones de edad de su padre. Motivos económicos le llevaron a trabajar en una empresa de seguros, sin olvidar en los ratos disponibles sus verdaderas preferencias, reanudando sus trabajos de campo y conectando de nuevo con sociedades científicas y científicos, tales como Antonio Español, Antonio de Bolós y Pío Font Quer, que le animaron a seguir una carrera universitaria. Por aquella época se fabricó su propio microscopio a partir de piezas que fue consiguiendo en el rastro de Barcelona (ver Fig. 11), lo que pone de manifiesto su capacidad como autodidacta y autosuficiente, que caracterizaría su estilo de trabajo para el resto de su vida. Campo, laboratorio y despacho fue la triada perfecta con la que consiguió madurar sus teorías (Fig. 2), proyectándose como complemento en la docencia universitaria.

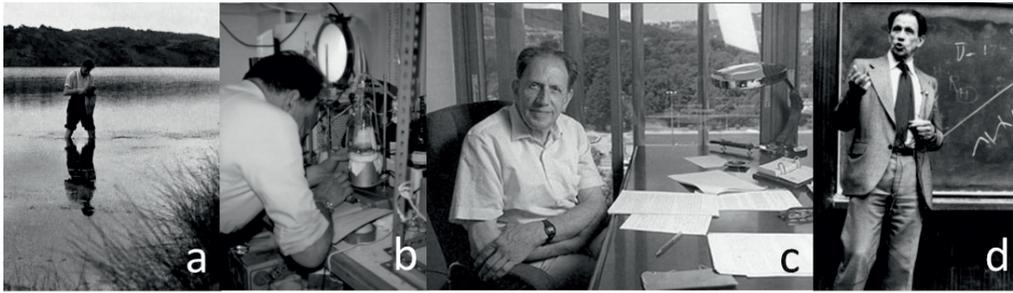


Figura 2. Campo, laboratorio, gabinete y aula: cuatro formas de trabajar para exponer sus conocimientos. (Fotos: a tomada de Montserrat, 2015; b y d de Peters, 2010; y c de Zamora y col., 2005).

Ante la posible implicación de España en la Segunda Guerra Mundial, Margalef fue nuevamente reclutado en 1941 y enviado a Mallorca. Y se repitió la misma escena. Su tiempo libre lo empleó en hacer un inventario de las aguas dulces de la isla, dedicándose especialmente a las microalgas y, con el director del Instituto Oceanográfico de Palma, desarrollando un estudio del plancton marino que sería posteriormente publicado en 1950.

Al licenciarse del servicio militar retomó la idea de la carrera universitaria, pero previamente tuvo que concluir el bachillerato. En 1945 se matriculó en Ciencias Naturales sin dejar sus trabajos de investigación y su formación autodidacta, finalizando en 1949 a la edad de 30 años, cuando ya tenía publicados 58 trabajos científicos. Recibe el encargo de montar un laboratorio en Blanes, inicia de manera informal su labor docente sobre identificación y conteo de fito-plancton, y empieza a trabajar en su proyecto de tesis doctoral sobre *Temperatura y morfología de los seres vivos*, que defendió en la Universidad Central de Madrid en 1951, cuando tenía 32 años y un bagaje de 82 publicaciones científicas. Un año más tarde se le ofrece un puesto en el recién creado Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP) en Barcelona. Durante su estancia en ese instituto viajó por muchos países visitando laboratorios de nivel internacional y asistiendo a congresos y reuniones científicas, facilitando a la vuelta detallados informes sobre los aspectos más interesantes y actuales tratados en cada una de las visitas, como apoyo al conocimiento del personal del instituto. En 1965, al fallecer en accidente el anterior director del IIP (García del Cid), es propuesto para la dirección, aceptando no muy convencido ya que nunca le agradaron las tareas burocráticas. Durante este periodo se iniciaron sus planteamientos teóricos a nivel de sistemas, demostrando al mismo tiempo profundos conocimientos como naturalista.

En 1956, en una reunión organizada por el Instituto Scripps de Oceanografía y la Oficina de Investigación Naval en California, presentó la ponencia

*Temporal succession and spatial heterogeneity in natural phytoplankton*, donde aplicaba los conceptos de la teoría de la información a la estructura y dinámica de las comunidades biológicas. A partir de ese momento Margalef se incorpora a la élite de los científicos y, en tan solo dos meses, fue recibido para impartir sus ideas en un buen número de universidades y centros de investigación de América. En 1957, aprovechando su discurso de ingreso en la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona, presentó el documento sobre *La Teoría de la Información en Ecología*, siguiendo la línea de lo ya expuesto en California, que traducido al inglés fue publicado en la revista *General Systematics* un año después, proyectándose a toda la comunidad científica. Y cuando en 1963 se publica en la revista *American Naturalist* el artículo *On certain unifying principles in ecology* consigue el reconocimiento internacional de los científicos dedicados a la ciencia ecológica, con indicadores que elevan a esa publicación a los primeros puestos por su influencia en la formación de los biólogos (Barrett & Mabry, 2002).

En 1967 opositó a la primera cátedra de Ecología de España, precisamente creada en la Universidad de Barcelona, diseñada para fijar al científico que desde hacía unos años gozaba de muy alto prestigio, y ante la posible inclinación hacia propuestas que pudieran venir de USA. Obtenida la plaza de Catedrático de Ecología cesó como director del Instituto de Investigaciones Pesqueras, aunque siguió compartiendo su trabajo en ambos centros.



Otra de las publicaciones excepcionales de Margalef surgió de un curso impartido en 1966 en la Universidad de Chicago, sede de una de las escuelas más importantes sobre teoría ecológica, y que posteriormente sería publicada en 1968 como el primer volumen de la revista *Chicago Series in Biology*, con el título *Perspectives in Ecological Theory* (Fig. 3).

Figura 3. Portada del libro *Perspectives in Ecological Theory* de Ramón Margalef, publicado en 1968 en la revista *Chicago Series in Biology*.

Figura 4. El Buque de investigación oceanográfica *Cornide de Saavedra* del Instituto Español de Oceanografía.



Sus sólidas conexiones con otros grupos internacionales le permitieron abordar proyectos con un mayor avance en la obtención de resultados. Se contaba también con el nuevo buque, *Cornide de Saavedra* (Fig. 4), de investigación oceanográfica, y la campaña en la región de afloramiento del noroeste africano permitió un enfoque integrado al considerar conjuntamente nutrientes, bacterias, fitoplancton, zooplancton, peces, bentos, sedimentos y estudios paleoceanográficos (Margalef, 1971).

Siempre fue un excelente profesor y tenía una forma original de transmitir los conocimientos y las ideas en sus clases y conferencias, llenas de interrelaciones y de planteamientos para sugerir nuevas cuestiones. Se propuso plasmarlas en un texto que obedeciera a esos principios. Después de varios años de intenso trabajo, más el tiempo que demora la logística del proceso de publicación de un libro, con las correcciones, preparación de gráficos, tablas y figuras, diseño, maquetado, encuadernación, etc., aparece en 1974 el texto de Margalef sobre *Ecología* (Fig. 5). Visto con la mirada y los conocimientos de un becario que estaba en pleno desarrollo de su tesis, cual era por aquel entonces mi caso, me pareció algo extraordinario y al mismo tiempo frustrante por no haber podido seguirlo durante la carrera. Al profundizar en su contenido me di cuenta de que no hubiera servido exclusivamente con el texto, hubiera necesitado también al profesor, y debo confesar que sentí cierta envidia de aquellos alumnos que pudieron pensar, disfrutar, sorprenderse y cuestionarse tras las explicaciones del maestro. Y sobre todo cuando más tarde lo conocí personalmente, pude charlar con él y observar la sencillez y la facilidad con que contaba las cosas, dejando siempre al final una palabra de aliento para seguir y varios comentarios para incitar a nuevas preguntas o incluso provocar la polémica.

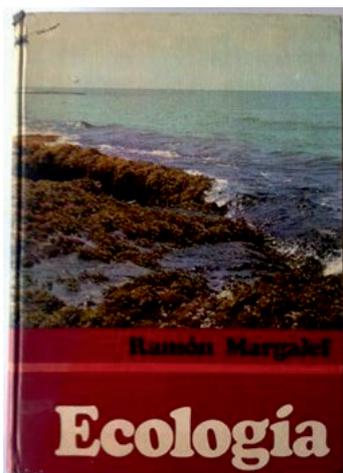


Figura 5. Portada del libro *Ecología* de Margalef publicado en su primera edición en 1974.

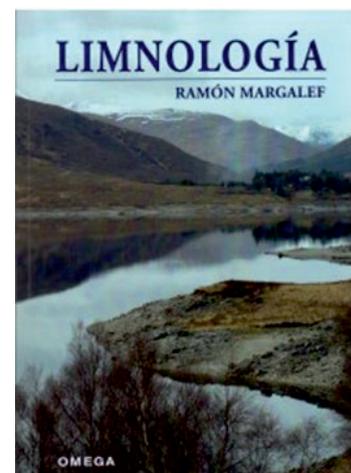


Figura 6. Portada del libro *Limnología* de Margalef publicado en su primera edición en 1983.

Era un texto que no se parecía a los que ese momento cubrían el mercado para apoyo de la asignatura que se cursaba fundamentalmente en la Licenciatura de Biología, con una estructura innovadora para destacar ciertos principios generales y la inclusión de algunos temas con tratamientos originales, como el capítulo de síntesis dedicado a la teoría ecológica, o la inclusión de un apartado para tratar la interacción del hombre y el resto de la naturaleza. En este último sentido Margalef resaltaba el interés científico de aprovechar los experimentos a gran escala que suponían ciertas actuaciones humanas para estudiar la respuesta ecosistémica (Terradas, 2005). La primera edición del texto de Ecología era un compendio de 951 páginas con un diseño cómodo y repleto de referencias y materiales de todo tipo, que ponían de manifiesto la capacidad de integración del autor, el volumen de sus conocimientos y la eficiencia en el manejo de la información.

En 1983, y con una estructura similar, se publica el texto sobre *Limnología* por la misma editorial (Fig. 6).

La producción científica del Prof. Margalef, no solo por su calidad, ya comentada por su impacto en el mundo científico y su influencia en el área de la ecología, sino también por su cantidad, mantenida a lo largo de todos los años de forma constante, con una media de casi ocho publicaciones anuales y escasa variación, supera las 540 contribuciones (Fig. 7) (pw 3), y en una inmensa mayoría como único autor. Sus primeras 4 publicaciones aparecen tempranamente en 1943. Cuando consigue la Licenciatura en Ciencias Naturales en 1949 ya contaba con 58, y al alcanzar el grado de doctor en 1951 la cifra ascendía a 82. Ningún año dejó de salir alguna de sus aportaciones hasta 2005. Algunas anualidades fueron

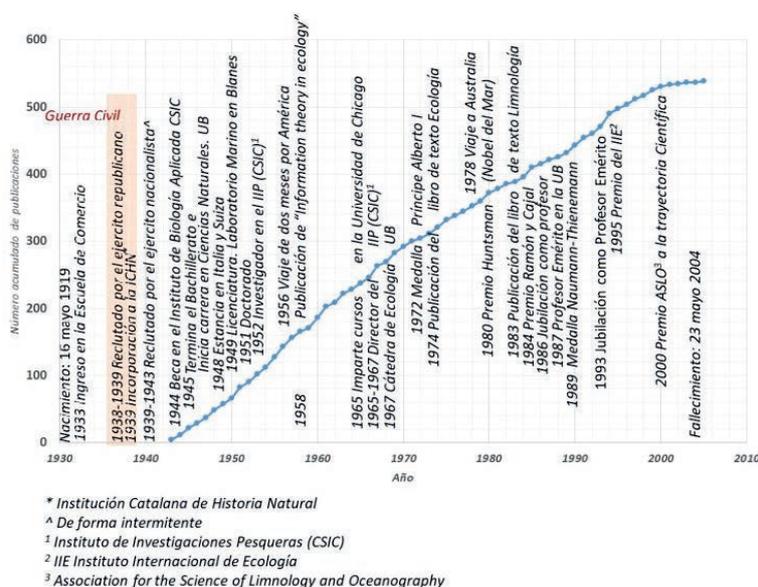


Figura 7. Evolución del número acumulado de publicaciones científicas del Dr. Margalef, expresada junto a fechas significadas de su trayectoria profesional.

realmente prolíficas, como la de 1994, cuando acaba de jubilarse y permanece en la universidad como Profesor Emérito, en la que se llegaron a publicar hasta 19 trabajos. En otros hay que destacar el esfuerzo productivo, como es el caso particular del periodo 1971-74 cuando está en plena redacción y publicación del texto de *Ecología* y al mismo tiempo aparecen 29 aportaciones científicas (Peters, 2010).

Los trabajos sobre biología marina y limnología son los más frecuentes, casi en la misma proporción, superando conjuntamente la mitad de sus contribuciones científicas a la ciencia (Fig. 8a). Pero también le dedicó a la temática sobre ecología general y ecología teórica un número significativo de trabajos, y en menor medida a las relaciones entre el hombre y la biosfera, metodologías y a la ecología evolutiva (Prat, 2015). Hizo notables contribuciones a la ecología acuática y a la ecología en general, postulando varios conceptos ecológicos unificadores sobre las propiedades estructurales y funcionales de los ecosistemas, a menudo controvertidos cuando se formularon, pero que al fin lograron una aceptación general (Ros, 2019).

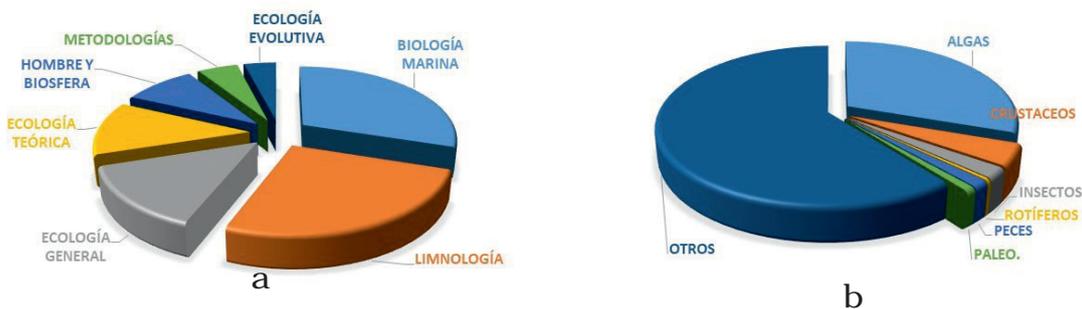


Figura 8. Distribución de la producción científica de Margalef en función de la temática (a) y de los grupos taxonómicos utilizados (b). (Simplificado de Prat, 2015).

Fundamentalmente sus estudios están basados en comunidades de algas, trabajando también con crustáceos, insectos, rotíferos y peces, alguna incursión en la paleoecología y una gran diversidad de otros organismos, reflejándose así su extraordinaria formación como un naturalista clásico (Prat, 2015) (Fig. 8b).

El impacto científico de sus publicaciones consigue metas solamente alcanzadas por los más importantes investigadores científicos, que medido como citas de acuerdo con las métricas actuales demuestran su influencia (Fig. 9) (pw 1). Para el periodo 1980-2019 llega a sumar 23.424, con un claro incremento a partir de 1999 hasta el 2015, descendiendo hasta las cifras actuales, aunque aún se mantienen valores sobresalientes tras quince años desde su fallecimiento. Resulta también significativa la respuesta inmediata de este índice de impacto tras

su muerte con un particular incremento, quizá como homenaje a su figura como maestro.



Figura 9. Índice de impacto en función del número de citas de las publicaciones científicas de Margalef. Fuente: Google Scholar. Fecha de consulta 09/2019.

Las publicaciones, como libros o artículos en revistas, de mayor aceptación por la comunidad científica o académica se recogen en la Tabla 1, (pw 1)

Tabla 1. Publicaciones de Margalef con mayor aceptación por la comunidad científica, expresada como valor absoluto o en función del valor medio anual para el periodo desde su publicación \*. Fuente. Google Scholar. Fecha de consulta 09/2019.

Publicación científica	año	citas	relativo*
Information theory in ecology <i>General Systems</i>	1958	3190	52,3
Ecología <i>Omega, Barcelona</i>	1974	2343	52,1
Limnología <i>Omega, Barcelona</i>	1983	1976	54,9
Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment <i>Oceanologica acta</i>	1978	1864	45,5
Perspectives in ecological theory <i>The University of Chicago Press</i>	1968	1209	23,7
On certain unifying principles in ecology <i>American Naturalist</i>	1963	976	17,4
Temporal succession and spatial heterogeneity in phytoplankton <i>in Buzsati-Traverso A.A. (ed.) Perspectives in Marine Biology</i>	1958	781	12,8
La teoría de la información en ecología <i>Memorias de la Real Academia de Ciencia y Artes de Barcelona</i>	1957	549	8,8
Teoría de los sistemas ecológicos <i>Universitat de Barcelona</i>	1991	512	18,3
Diversidad de especies en las comunidades naturales <i>Publicaciones del Instituto de Biología Aplicada, Barcelona</i>	1951	419	6,2
Diversity and stability: a practical proposal and a model of interdependence <i>Brookhaven symposia in biology</i>	1969	350	7,0
Our biosphere <i>Ecology Institute</i>	1997	320	14,5

destacando por su valor absoluto la versión en inglés de la *Teoría de la Información en Ecología*, publicada en *General Systems* en 1958, que se complementa con el discurso recogido en las Memorias de la Real Academia de Ciencia y Artes de Barcelona de un año antes. El artículo *On certain unifying principles in ecology* de 1963 es un clásico que figura entre los diez mejores de la biología del siglo pasado (Ros, 2019). Los dos libros de texto alcanzan

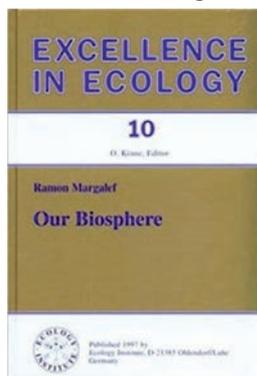


Figura 10. Portada del último libro publicado de Ramón Margalef *Our Biosphere. Excellence in ecology*, por el Instituto de Ecología de Oldendorf en 1997.

también índices muy elevados, con distinta posición dependiendo de si se considera el valor absoluto o el relativo en función del número de años desde su publicación. El último libro, publicado en 1997 (*Our Biosphere*) (Fig. 10) es un testamento apasionado y apasionante de sus ideas sobre los temas que más le motivaron intelectualmente (Terradas, 2015), y presenta en la actualidad un notable índice relativo de impacto.

Aunque puede llamar la atención que la mayoría de las aportaciones científicas de Margalef están firmadas únicamente por él, su labor académica como maestro en investigación se manifiesta igualmente como notable, pues ha dirigido 39 tesis doctorales. Una mayoría de sus antiguos alumnos son, o han sido, profesores universitarios o investigadores en centros de investigación que han conseguido puestos de relevancia en el tablero de la ciencia y han formado, a su vez, a un buen número de científicos (en total y hasta ahora cerca de los tres centenares), que integran, junto a los alumnos que han seguido sus enseñanzas en las licenciaturas de la universidad, y los que han bebido de forma indirecta los conocimientos del maestro, una gran familia Margalefiana, empapada de sus ideas e inquietudes.

El reconocimiento internacional de la labor docente e investigadora del Prof. Margalef fue resaltado con prontitud (Fig. 11). Desde 1971, cuando fue galardonado con la Medalla Príncipe Alberto del Instituto de Oceanografía de París, ha sido también distinguido; en 1980 con el Premio Hunstman a la Excelencia en la Investigación Marina del Instituto Bedford de Oceanografía, coloquialmente conocido como el Nobel del Mar; en 1989 con el Premio Italgas de Medio Ambiente de Italia y la Medalla Naumann-Thienemann de la Asociación Internacional de Limnología Teórica y Aplicada; en 1980 con el Premio Alexander von Humboldt de Alemania; en 1993 con el Premio Internacional de Medio Ambiente San Francisco de Asís de Italia; en 1995 con el Premio del Instituto Internacional de Ecología; en 1998 con el Gran Premio de Oceanografía de Mónaco; y en 2000 con el Premio de la Asociación de Ciencias en Limnología y Oceanografía, por su trayectoria científica. Podría decirse que es el investigador español más conocido internacionalmente, comparable a las figuras de Ramón y Cajal y Severo Ochoa.

A nivel nacional se le concedió el Premio Ramón y Cajal en 1984, la encomienda de Alfonso X el Sabio en 1990, y la Medalla de Oro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en 2002. Por su parte, el Gobierno Catalán le otorgó la Medalla Narcís Monturiol en 1983, el premio de la Fundación Catalana de Investigación en 1990, la Cruz de San Jordi en 1997, y la Medalla de Oro en 2003.

### Homenaje al Prof. Ramón Margalef en la conmemoración de su centenario

En su investidura como Dr. Honoris Causa por la Universidad de Alicante



Recibiendo la Medalla de Oro del CSIC

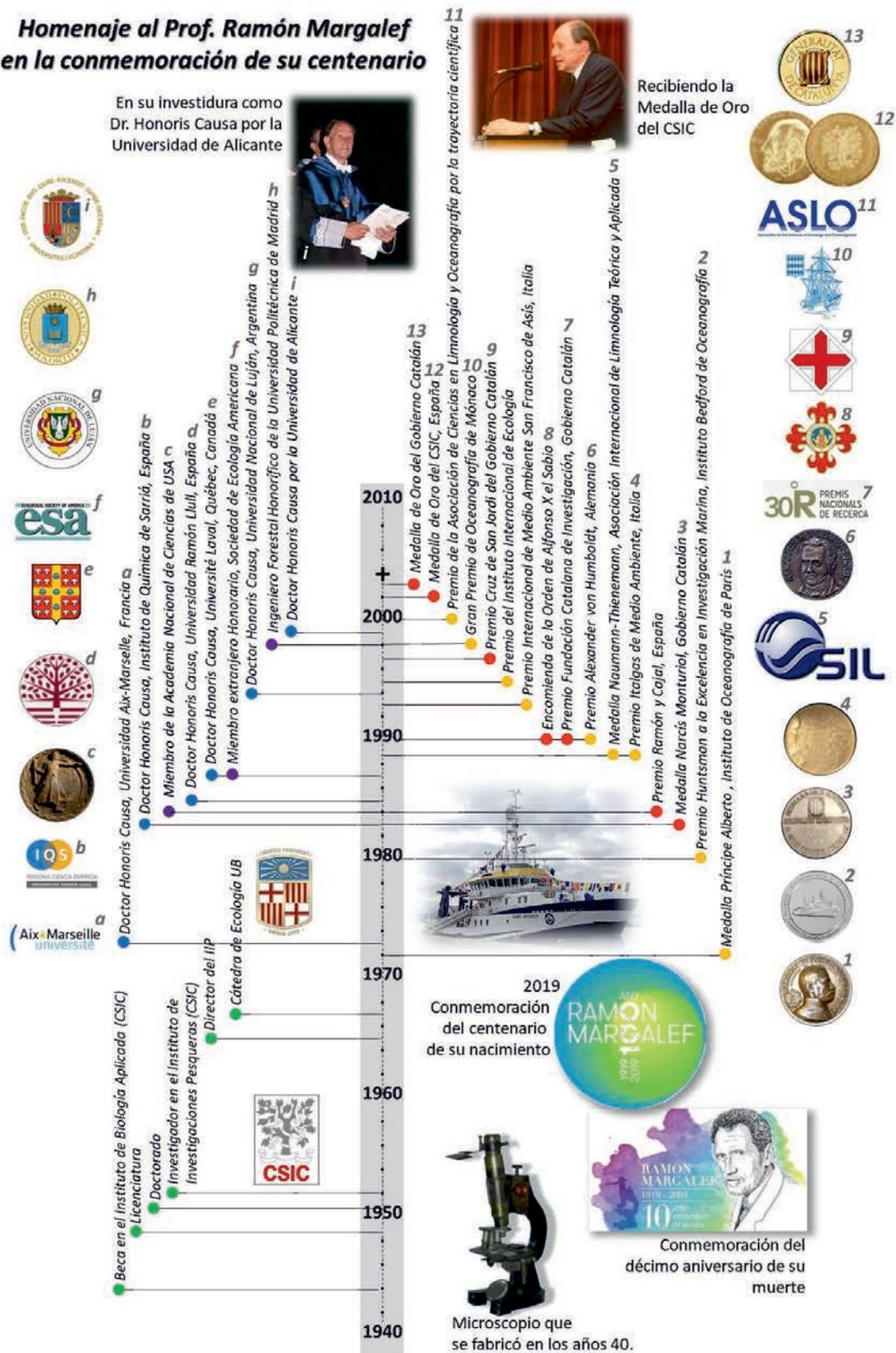


Figura 11. Cronograma de honores y distinciones del Prof. Margalef.

Ha sido distinguido con el Doctorado *Honoris Causa* por la Universidad Aix-Marseille de Francia, del Instituto de Química de Sarriá de Barcelona, de la Universidad Ramon LLull de Barcelona, de la Universidad Laval de Québec en Canadá, de la Universidad Nacional de Luján en Argentina, y la Universidad de Alicante. También ha sido nombrado Miembro de la Academia Nacional de Ciencias de USA, Miembro extranjero Honorario de la Sociedad de Ecología Americana, e Ingeniero Forestal Honorífico de la Universidad Politécnica de Madrid.

Se conserva también su memoria en la nomenclatura taxonómica, ya que un género y diecisiete especies recuerdan su apellido (Fig. 12). Y tras su fallecimiento, en su nombre y con su nombre la Generalitat de Cataluña crea el Premio del Departamento de Medio Ambiente y el Gobierno Catalán crea el Premio internacional de Ecología (Fig. 12), ambos en 2004. El edificio principal de la



Figura 12. La microalga *Picarola margalefii* (Cros & Estrada), cocolitóforo descrito en el Mediterráneo (izda.), fue así bautizada científicamente en honor al Dr. Margalef, y ha servido de inspiración para el logo de los premios que llevan su nombre (centro) y para el galardón que se entrega a los premiados, obra de la Joyería Capdevilla (dcha.). Fuente: [web.gencat.cat](http://web.gencat.cat).

facultad de Biología de la Universidad de Barcelona lleva su nombre desde 2005 (Fig. 13 a), y coincidiendo con el décimo aniversario de su defunción (23 de mayo de 2004) se ha hecho mucho más visible su legado, mostrando una reconstrucción libre de su despacho (Fig. 13 b), abierto al público, que contiene los libros y trabajos por él publicados y algunos utensilios y materiales que utilizó. El



Figura 13. El edificio central de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona lleva el nombre del que fuera su Catedrático de Ecología (a), y en él se conserva el despacho que ocupó en activo (b). Fuente: [www.ub.edu/margalef/](http://www.ub.edu/margalef/).

Consejo Social de su Universidad estableció el premio Ramón Margalef para recompensar trabajos de los estudiantes en Ciencias Experimentales y de la Salud. En 2009 una nueva embarcación de investigación del Instituto español de Oceanografía lleva su nombre (ver Fig. 11), al igual que el Premio a la Excelencia en Educación de la Asociación Americana de Limnología y Oceanografía (ASLO).

La Universidad de Barcelona tiene abierta una página Web activa con su nombre, conocida como espacio Margalef, con referencia a su obra y reconocimientos públicos, y donde se le recuerda en el décimo aniversario de su fallecimiento y en el centenario de su nacimiento.

### Bibliografía

- Armengol, J. 2006. Ramon Margalef (1919-2004): teacher and researcher. *Limnetica* (25):1-8.
- Barrett, G. W. and K.E. Mabry. 2002. Twentieth-Century Classic Books and Benchmark Publications in Biology. *BioScience* 52:282-285.
- Bonnin, P. 1994. *Ramon Margalef*. Fundació Catalana per a la Recerca. Barcelona. España. 184 pp.
- Gracia, C. 2008. A human and scientific portrait of Ramon Margalef (1919-2004). En: Valladares, F., Camacho, A., Elosegui, A., Gracia, C., Estrada, M., Senar, J.C., Gili, J.M. (eds). *Unity in Diversity. Reflections on Ecology after the legacy of Ramon Margalef*. 21-38. Fundación BBVA.
- Margalef, R. 1971. Una campaña oceanográfica del Cornide de Saavedra en la región de afloramiento del noroeste africano. *Investigación Pesquera* 35 (supl.):1-39).
- Margalef, R. 1974. *Ecología*. Ediciones Omega S.A. 951 pp.
- Margalef, R. 1983. *Limnología*. Ediciones Omega S.A. 1010 pp.
- Mateu, G. 2004. In memoriam Ramón Margalef (1919-2004), el sabio, el maestro y el amigo. *Boletín de Historia Natural de Baleares* 47: 163-173.
- Montserrat, P. 2015. Recordant a Ramón Margalef, l'amic intel·ligent i bo que sabia estimar. *L'Atzavara* 25:125-128.
- Peters, F. 2010. Ramón Margalef, The curiosity driven life of a self-taught naturalist. *Advancing the Science of Limnology and Oceanography*. ASLO, Waco. USA. 76 pp.
- Prat, N. 2015. Ramón Margalef (1919-2004). Una obra ingente no totalmente bien reconocida. *Ecosistemas* 24(1):97-103.
- Prat, N. 2015 a. Stability, resilience and sustainability: a tribute to Ramon Margalef, 10 years after his death. *Limnetica*. 34(2):457-466.
- Ros, J.D. 2006. Professor Ramón Margalef. (1919-2004). Biography and Bibliography. *Contributions to Science* 3(2):297-317.

- Ros, J.D. 2019. Ramón Margalef, el ecólogo total. *Investigación y Ciencia*. Número especial 40:4-5.
- Terradas, J. 2005. ¿Sabía Ramón Margalef de medio ambiente? *Ecosistemas* 14(1):62-65.
- Terradas, J. 2015. El pensamiento evolutivo de Ramón Margalef. *Ecosistemas* 24(1):104-109.
- Zamora, R., Sabater, S., Cortina, J. 2005. Homenaje a Ramón Margalef. *Ecosistemas* 14(1).

### Referencias electrónicas

Todas ellas han sido consultadas durante el mes de septiembre de 2019.

pw 1. Citas en Google Scholar del Dr. Margalef en el periodo 1980-2019.

<https://scholar.google.com/citations?user=d3w4mPIAAAAJ&hl=en>

pw 2. Discurso pronunciado por el Dr. Ramón Margalef i López con motivo de su investidura como Doctor *Honoris Causa* por la Universidad de Alicante.

<https://web.ua.es/es/protocolo/documentos/eventos/honoris/margaleff-i-lopez-ramon-1999/discurso-ramon-margalef-i-lopez.pdf>

pw 3. Listado de publicaciones del Dr. Margalef.

<http://www.ub.edu/margalef/docs/web.pdf>

pw 4. Reproducción de la entrevista realizada en 1985 a Ramón Margalef en la revista Campus Digital de la Universidad de Murcia por Francisco Torrella.

<https://www.um.es/campusdigital/TalComoEra/margalef.htm>

pw 5. Teoría de la Información aplicada a la ecología. Ramón Margalef. Introducción al curso "Creación de modelos de simulación en ecología y medioambiente"

<http://www.dinamica-de-sistemas.com/cursos/margalef.htm>

pw 6. A.G. Huntsman Award for Excellence in the Marine Sciences. 1980.

<https://huntsmanaward.weebly.com/1980-ramon-margalef.html>

## AMBIÓLOGOS DE AQUÍ

### Orinoco: indígenas, peces y mercurio

Luis Eduardo Pérez Álvarez

Durante 39 años vividos en la Orinoquia venezolana acumulé una gran diversidad de experiencias y realizaciones imposibles de comunicar en corto espacio. Pero intentaré una apretada enumeración de algunas. El año 1979, dos meses después de presentar la tesina en la facultad de Ciencias Biológicas de León, me fui a Venezuela. Antes de ingresar como investigador a la Estación de Investigaciones Hidrobiológicas de Guayana de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales (FLASA) trabajé como fotógrafo de las páginas sociales de un periódico caraqueño. Después realicé investigaciones en peces (biología, estructura de comunidades, dinámica de poblaciones, uso espacial) y más adelante me moví hacia la piscicultura. Tuve el prematuro honor de que le pusieran mi apellido a una anchoa dulceacuícola, enana y neoténica que no encajaba en las especies conocidas, cuya biología había estudiado en profundidad en campo y en laboratorio: *Anchoiella perezii* (Cervigón, 1987). Desarrollé tecnología innovadora de jaulas flotantes e hice ensayos experimentales y piloto que obtuvieron algunos reconocimientos, incluyendo el de un proyecto de la FAO. También produje alevines de *Colossoma macropomum* y de su cruce con *Piaractus brachypomus*, destinados a promover otra modalidad de piscicultura que aprovechaba numerosos microembalses de uso agrícola existentes en muchas explotaciones ganaderas. En 1991 diseñé y construí la primera piscifactoría flotante de Venezuela y de la América tropical (anclajes, estructuras portantes, jaulas rígidas de 120 m<sup>3</sup> rotativas, autolimpiantes y resistentes a pirañas, plataforma de servicios, tanque anfibio de transporte de alevines y otros equipos, **Fig. 1A**), formé su personal y dirigí su operación y mercadeo, vendiendo más de 20.000 kg anuales a población de escasos recursos. Di respuesta a empresarios interesados en producción de caviar que, siguiendo mis pautas, lograron que el esturión californiano creciera más rápido en los Andes venezolanos que en California y en un embalse construí con buzos un recinto de pesca recreativa para un club deportivo. Entre 2004 y 2009 participé en el proyecto “Desarrollo Eco-socio-económico del Corredor del Orinoco” de la Universidad Nacional Experimental de Guayana, enmarcado en la

Forma de mencionar este artículo: Pérez Álvarez, L.E. 2019, Orinoco: indígenas, peces y mercurio. AmbioCiencias, 17, 100-103. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

metodología investigación-acción, capacitando pescadores ribereños como piscicultores. En la última década diseñé y probé exitosamente un prototipo de jaula flotante de 20 m<sup>3</sup> para piscicultura familiar en cuatro sitios del Delta del Orinoco, que rindieron 500 kg cada una en menos de un año (**Fig. 1B**).



**Figura 1.** **A)** Tecnología de jaulas rígidas desarrollada y comprobada dos décadas en el embalse hidroeléctrico Macagua, en medio de Ciudad Guayana. **B)** Jaula flotante gestionada por una familia en caño Guara, Delta del Orinoco.

También anduve por Haití en un par de misiones de un proyecto relacionado con reducción de deforestación. Participé en numerosos grupos de trabajo y comisiones, así como reuniones técnicas y congresos en diversos países sudamericanos. El azar me puso en situación de diseñar y coordinar la ejecución de un amplio estudio en 1995 que encendió la alarma sobre la contaminación por mercurio de peces del embalse hidroeléctrico de Guri (4.200 km<sup>2</sup>), en cuya cuenca se extrae oro masivamente. Desde entonces puse en marcha un Laboratorio de Mercurio desde el que hice algunas investigaciones sobre su bioacumulación en ecosistemas acuáticos y desarrollé un eficaz dispositivo para que los mineros pudiesen reciclar el mercurio.

Mucha diversidad de proyectos con equipos humanos que formé, muchas movidas en todoterrenos y canoas, a veces en helicópteros y avionetas, en numerosas expediciones a ríos, selvas y sabanas satisficieron las ganas de aventura que llevaba, combinadas con deseos de contribuir a resolver problemas de alimentación y, más adelante, de contaminación. Describiré ahora algunos detalles de mi tema predilecto.

Mi primer contacto con el mundo indígena ocurrió el verano del año 1978, cuando participé en una expedición organizada por mi amigo y compañero de estudios, el padre dominico Pablo Zabala, para coleccionar mamíferos, aves y otros elementos faunísticos del Amazonas peruano, destinados a la colección del Museo de Historia Natural de la Virgen del Camino. Además de sentirme envuel-

to por el mayor bosque tropical del planeta, lo más impactante fue la oportunidad de conocer de cerca remotas comunidades amerindias Machiguengas, con una cosmovisión y un concepto de la vida y de las relaciones sociales muy lejanos a los de mi civilización. En aquel primitivo grupo humano recibí lecciones de paz, armonía, respeto y solidaridad que me hicieron ver que nuestra cultura había evolucionado en muchos aspectos, pero había involucionado en otros. Desde entonces profeso respeto y admiración a aquellos indígenas que todavía hoy tienen coraje para permanecer fieles a sus valores y a sus culturas.

Colaboré una década de voluntariado desde el año 2003, cuando el hermano Korta, jesuita vasco, me pidió apoyar a la Universidad Indígena de Venezuela (Tauca) de pies descalzos en aulas de barro bajo el bosque (**Fig. 2**). Fue un extraordinario e innovador experimento concebido y motorizado por él, que consistió en estructurar vínculos entre diversos pueblos indígenas, cuyos representantes convivían ocho meses cada año en un espacio común de indagación, reflexión, aprendizaje y reivindicación de derechos territoriales y culturales. Con un dilema de fondo: disolverse en la sociedad criolla o resistir en sus hábitats ancestrales sin renunciar a sus culturas. Tuve el honor de formar parte del Consejo Rector junto a ancianos indígenas, y de llegar a presidir la Fundación Causa Amerindia Kiwxi. En el año 2009 logramos allí la mayor cosecha registrada en estanques al sur del Orinoco: 8.000 kg de peces en una hectárea.



**Figura 2. A)** Clase de piscicultura en la Universidad Indígena de Venezuela (Tauca 2005). **B)** Jornadas de análisis de gestión de diversos recursos con indígenas Höti y E'ñepá (Kayamá, Cuenca del río Cuchivero, 2008).

Colegas de la Wildlife Conservation Society (WCS) propusieron a FLASA determinar los niveles de contaminación de los peces que consumían los preocupados indígenas Ye'kwana y Sanema en la cuenca del Caura, invadida por mineros explotadores de oro. Entre ambas instituciones realizamos en el año 2010 el estudio de mercurio total en músculo de las especies más consumidas. Lo había proyectado resolviendo una compleja logística para mantener las muestras con-

geladas en nitrógeno líquido desde su captación en parajes remotos hasta su análisis en nuestro laboratorio. Resultó que la gran mayoría de las muestras de peces carnívoros sobrepasaban el nivel permisible establecido por la Organización Mundial de la Salud. Las reclamaciones indígenas no fueron atendidas por las autoridades, así que, nuevamente, las mismas instituciones, junto a un médico investigador de la Universidad de Oriente, nos hicimos cargo de determinar sus niveles de exposición al metilmercurio. Considerando que los mayores riesgos ocurren durante la gestación y lactancia, y que el análisis de distintos segmentos de los largos cabellos femeninos permitiría obtener una serie temporal de niveles de mercurio presentes en el organismo, en 2011 realizamos el trabajo de campo para tomar 152 muestras de cabello de mujeres y niñas indígenas en cinco comunidades. Resultó que el 36,8 % excedieron el nivel de 10 mg/kg de mercurio total. La OMS atribuía a este nivel de exposición un riesgo de que un 5% de las mujeres embarazadas dieran a luz niños con desórdenes neurológicos. Incluso el 7,2% superó el nivel de 20 mg/kg. Adicionalmente, se comprobó que la concentración de mercurio total en las pacientes se incrementó con el paso del tiempo.

Pero las huellas más profundas que quedan en mis registros de vida las dejaron otras vivencias, tal vez colaterales a mis funciones de investigador: Mis peregrinajes solitarios a través de áreas deshabitadas del Parque Nacional Canaima (Gran Sabana) -edén inmenso, intacto y apoteósico- expediciones de trabajo por selvas de las cuencas del Caura, Kayamá, Cuyuní, Purús, mis amistades con indígenas, campesinos y pescadores, con habitantes de urbanizaciones acomodadas y de barrios marginales, siempre interesado en contrastar sus culturas y en comprender qué valores humanos subyacen en cada una de ellas. He acumulado un extenso capital de experiencias que me hace sentir rico, afortunado y dispuesto a no abandonar la apasionante actitud de “curioseador de profesión”. Algunos días despierto sintiendo que hice una larga expedición de 39 años por las regiones equinocciales y que ahora he llegado a la tranquilidad de mi apartado laboratorio en la aldea gallega de mis abuelos, para procesar y descifrar todo el material que voy desempaquetando de las bodegas de mi memoria, fruto de mis observaciones de diversidades paisajísticas, biológicas y culturales.

### **Bibliografía**

Cervigón, F. 1987. Las especies del género *Anchoviella* de Venezuela (Pisces: Engraulidae). *Contribuciones Científicas, Escuela de Ciencias ADD* N° 14:1-32

## MI PROYECTO DE TESIS

### **Análisis metodológico para la estimación de la vulnerabilidad por inundaciones. Ejemplo de aplicación en el municipio de Ponferrada (León, España)**

Laura Tascón González

Departamento de Geografía y Geología, Área de Geodinámica Externa. Facultad de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León.

Los desastres naturales son un tema de creciente actualidad a nivel social y económico, ya que durante las últimas décadas se han registrado un aumento significativo del impacto de los mismos. Una de las principales explicaciones de este incremento es el aumento de la población, la infraestructura, la producción y la localización en zonas peligrosas, dando lugar a un mayor número de daños materiales y personales y por tanto a una mayor pérdida económica. Según datos proporcionados por la ONU en su informe sobre la Estrategia para la Reducción de los Desastres Naturales, las principales catástrofes naturales que amenazan a España son las sequías, terremotos e inundaciones y más concretamente estas últimas (Ministerio del Interior, 2015), encontrándonos con más de 2400 referencias históricas en los últimos 500 años, lo que significa una media de unas cinco inundaciones de importancia por año (Berga, 1997).

Este tipo de fenómenos naturales no afecta a todos por igual, sino que el grado de sus daños es proporcional a la vulnerabilidad de las comunidades y los territorios (Vargas, 2002). Esto supone que la reducción de dicha vulnerabilidad permitiría ahorrar millones de euros, evitar la pérdida de gran parte de la riqueza acumulada y, sobre todo, salvar vidas humanas.

Teniendo en cuenta estas particularidades, la finalidad de esta tesis es desarrollar un análisis de la vulnerabilidad de inundaciones en el norte de la provincia de León. Para ello, se ha realizado un análisis bibliográfico de las distintas definiciones del concepto de vulnerabilidad observando su evolución histórica desde principios del siglo XX, cuando fue utilizado por primera vez, hasta la actualidad. Asumiendo que no existe un acuerdo unánime en la descripción del término de vulnerabilidad, se ha delimitado dicho concepto mediante una nueva definición adaptada a las circunstancias actuales, entendiendo esta como:

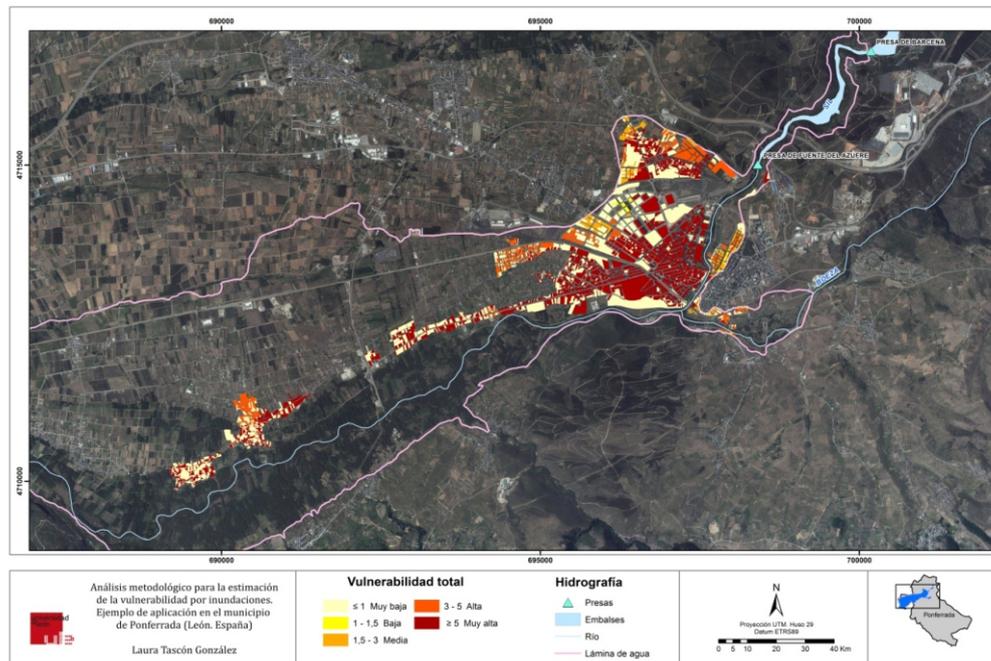
Forma de mencionar este artículo: Tascón, L. 2019, Análisis metodológico para la estimación de la vulnerabilidad por inundaciones. Ejemplo de aplicación en el municipio de Ponferrada (León, España). *AmbioCiencias*, 17, 104-106. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

*“La susceptibilidad de un elemento o grupo de elementos bajo riesgo, resultado de un fenómeno natural desestabilizador de origen natural o antropogénico de una magnitud dada. Dicha vulnerabilidad se podrá medir en una escala de 0-1 y vendrá determinada por: (i) el grado de exposición de factores sociales, físicos, económicos y ambientales y por (ii) la capacidad de resistencia frente al fenómeno, es decir, por la capacidad de protección y reacción inmediata y por la capacidad de recuperación o resiliencia”.*

A partir de esta definición y de la selección y descripción de los factores e indicadores que especifican las características de la sociedad (edad, sexo, salud), las particularidades físicas del medio (infraestructuras...) y la economía del territorio, se ha propuesto un método de análisis para la cuantificación de la vulnerabilidad (en concreto el riesgo de inundación), basado en el índice de vulnerabilidad. Este índice normaliza los valores de los distintos indicadores en un rango de 0-1 mediante funciones de transformación, de esta manera se pueden confrontar de forma objetiva los resultados obtenidos con otras zonas de estudio. Una vez establecidos los valores normalizados de los indicadores, el método asigna distintos pesos a cada uno de los mismos en función a su importancia, obtenidos en su mayor parte por un panel de expertos mediante el método AHP (*Analytic Hierarchy Process*). De todos los indicadores seleccionados para esta tesis destaca, entre otros, el tiempo de evacuación, puesto que hasta ahora, sólo se había utilizado para la gestión de emergencias y es la primera vez que se utiliza como indicador a la hora de definir la vulnerabilidad. Otra de las novedades que presenta esta investigación es la escala de trabajo, que permite que su aplicación tenga como unidad básica de información la parcela urbana en cualquier tipo de población, incluso núcleos de más de 20000 habitantes, ya que la máxima escala de trabajo utilizada hasta el momento ha sido a nivel municipal.

La validez del método propuesto se ha comprobado aplicándolo en la zona urbana del núcleo de Ponferrada (León) para el caso de una hipotética inundación por rotura de la presa de Bárcena y de forma concatenada, a la rotura de la presa de Fuentes del Azufre. En conclusión, se puede decir que el índice de vulnerabilidad de Ponferrada ante una inundación de este tipo es bastante elevado (**Fig. 1**), debido a su baja resistencia y a su alto grado de exposición principalmente en indicadores socio-económicos entre los que destacan el tiempo de evacuación y los usos de suelo. Con este ejemplo de aplicación se demuestra la eficacia del análisis y el método de estimación de la vulnerabilidad, pudiendo tener una aplicación universal en otros escenarios y zonas de estudio, con los ajustes necesarios para su adaptación a los distintos tipos de riesgos.

MAPA DEL ÍNDICE DE VULNERABILIDAD TOTAL



**Figura 1.** Índice de vulnerabilidad de inundaciones frente a la hipotética rotura de la presa de Bárcena en Ponferrada.

### Bibliografía

- Berga, L. 1997. Los embalses en la laminación de avenidas en España. *Revista de obras públicas. Ciencia y Técnica de Ingeniería Civil* 144 (3371): 155-161.
- Danumah, J.H., Odai, S.N., Saley, B.M., Szarzynski, J., Thiel, M., Kwaku, A., Koffi, F. & Akpa, L. 2016. Flood risk assessment and mapping in Abidjan district using multi-criteria analysis (AHP) model and geoinformation techniques, (Cote d'Ivoire). *Geoenvironmental Disasters* 3(10): 1-13.
- Ministerio del Interior. 2015. Anuario estadístico del Ministerio del Interior, 778 pp.
- Ruiz, M. 2011. Vulnerabilidad territorial y evaluación de daños postcatástrofe: una aproximación desde la geografía del riesgo. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Vargas, J. 2002. Políticas públicas para la reducción de la vulnerabilidad frente a los desastres naturales y socio-naturales. Naciones Unidas. CEPAL. 84 pp.

## EDUCANDO EN LO NUESTRO

### La visión de los alumnos acerca de las competencias generales y transversales de los Grados en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales de la Universidad de León

Marta Eva García-González

Profesora Titular del Departamento de Biodiversidad y Gestión Ambiental, Área de Botánica, Universidad de León. Coordinadora del Grupo de Innovación Docente COMBIO. [megarg@unileon.es](mailto:megarg@unileon.es)

#### Resumen

El grupo de innovación docente COMBIO (análisis y actualización de competencias en las titulaciones de la Facultad de CC. Biológicas y Ambientales) se creó en 2014, en la primera convocatoria de formación de estos GID en nuestra Universidad. Anteriormente el equipo humano constituyente de este grupo, ya había obtenido un PAID (Plan de Apoyo a la Innovación Docente) para trabajar en estos temas (convocatoria PAID-2014). El grupo ha estado formado, a lo largo de su historia, por un total de 11 profesores de distintas áreas de nuestra Universidad, el mayor número de ellos vinculados de alguna manera a cargos de gestión de la Facultad de CC. Biológicas y Ambientales, 4 miembros del PAS y un alumno representante de la Facultad. Hasta el momento han completado la parte de la investigación relativa a la visión del alumnado acerca de si las competencias transversales y generales que figuran en las Memorias de verificación de los tres Grados de la Facultad se trabajan y evalúan en las distintas asignaturas y han iniciado ya las investigaciones correspondientes a la visión del profesorado de estas asignaturas y la de los egresados de las tres titulaciones.

Palabras clave: competencias transversales, COMBIO, evaluación de competencias, Biología, Biotecnología, Ciencias Ambientales.

#### Introducción

El grupo de Innovación Docente COMBIO empezó su andadura en el año 2014 a partir de un PAID concedido en la convocatoria de ese año, y surgió de la necesidad de mejorar el procedimiento de evaluación de competencias en los Grados de Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales, pues se detectaron una serie de deficiencias que podían dificultar el proceso de renovación de la acreditación en el que se encontraba inmersa la Facultad de CC. Biológicas y Ambientales en aquel curso académico. El objetivo final era poder adecuar en un futuro las Memorias de Verificación y las Guías Docentes a la realidad.

Forma de mencionar este artículo: García-González, M.E. 2019, La visión de los alumnos acerca de las competencias generales y transversales de los Grados en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales de la Universidad de León. *Ambiociencias*, 17, 107-116. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

Se eligieron en un primer momento las competencias genéricas y transversales porque estas son, fundamentalmente, las que deben de ser coordinadas entre todas las materias de cada Grado, para garantizar su consecución. Es por ello por lo que el equipo de trabajo estuvo formado, en su mayor parte y desde un primer momento, por personas que estaban o habían estado muy relacionadas con la gestión de estos Grados. Era importante, dada la naturaleza del Proyecto, que estuvieran representados todos los estamentos que integran la Universidad. A lo largo del tiempo de existencia del grupo, algunas personas han causado baja en el GID y han sido reemplazadas por otras que, en muchos casos, entraban a hacerse cargo de la organización docente de la Facultad, en diversos puestos.

El Real Decreto 1393/2007 de Ordenación de las Enseñanzas Universitarias modificado por distintas normativas (Real Decreto 861/2010, Real Decreto 96/2014, Real Decreto 43/2015) y el Marco Europeo de Educación Superior (Real Decreto 1027/2011), incluyen dos tipos de competencias en la enseñanza universitaria: las competencias específicas relativas a las distintas disciplinas de un Grado, y las competencias transversales, que se entienden como una necesidad social y profesional. Las demandas del mercado laboral sitúan a España en el grupo de países de la UE con mayor desajuste entre formación y empleo (Martínez y González, 2018). Una de las deficiencias que se subrayan en este sentido, es el escaso desarrollo de las competencias genéricas (transversales) durante la formación universitaria. Ha habido varias iniciativas que han intentado vincular las competencias de los universitarios con las actividades desarrolladas en entornos específicos de trabajo. Este enfoque ha impulsado el desarrollo de diferentes estrategias de innovación docente tendentes a la mejora de los procesos de aprendizaje y evaluación de los universitarios (Vive Búa *et al.*, 2015; Aguado *et al.*, 2017).

El desarrollo de competencias genéricas es un objetivo importante para la mayor parte de las Universidades, así como el análisis y estudio de la situación en la que se encuentran en los planes de estudio. El proyecto Tuning América Latina (2007) ha sido un referente usado como base en distintas instituciones. Sin embargo, es necesario ir más allá del modelo definido en este proyecto y establecer las competencias más relevantes para cada titulación. De este modo se resolvería uno de los principales problemas que existen actualmente, como es la falta de selección de un número realista de estas competencias. (Villarroel y Bruna, 2014). En este sentido, son varios los autores que, en los últimos años, han evaluado las competencias genéricas desde varios prismas o se han ocupado de indicar algunos de los métodos más eficaces para trabajarlas y evaluarlas (Baños y Pérez, 2005; Rodríguez, 2006; Valero *et al.*, 2007; García *et al.*, 2008; García *et al.*,

2010; Tobón *et al.*, 2010; Miró y Jaume i Capó, 2011; Villa y Poblete, 2011; Velasco *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2013; Sabariego, 2015).

De acuerdo con Quintana *et al.* (2007), los alumnos que ingresan a la universidad deberían poseer ciertas competencias generales, indispensables para asegurar su permanencia en ella, la consecución de sus estudios y garantizar al alumno el éxito en cualquier ámbito del saber. En cualquier caso, la universidad debería garantizar la adquisición de estas competencias al finalizar sus estudios en ella.

En una primera fase de este Proyecto de innovación, se pretendió analizar la opinión que tenían los alumnos acerca de si las competencias genéricas que se incluían en las Guías Docentes de las distintas asignaturas, y por ende en las Memorias de Verificación de los tres Grados de la Facultad, eran trabajadas y evaluadas y de qué forma, puesto que se habían detectado que en algunas de estas Guías Docentes se incluía un número excesivo de estas competencias y además, leyendo los métodos de trabajo y evaluación que aparecían en ellas, se vio que no podía ser que estuvieran siendo trabajadas.

Algunos de los resultados de las investigaciones fueron dados a conocer en el I Congreso Virtual Internacional de Educación, Innovación y TIC. REDINE, en el 3rd Virtual International Conference on Education, Innovation and ICT, en el III Congreso Virtual Iberoamericano sobre Recursos Educativos Innovadores (CIREI), en las I Jornadas de Buenas Prácticas en Evaluación Formativa en Docencia Universitaria (Vega Maray *et al.* 2019a y Calvo *et al.* 2019), en Vega Maray *et al.* 2019b, y en Calvo *et al.*, 2017. En estos trabajos se pueden consultar con detalle los resultados para los tres Grados, en cuanto a la opinión de los alumnos.

Los análisis llevados a cabo se basaron únicamente en la opinión de los alumnos. Actualmente, se está recopilando la opinión de los profesores responsables de las asignaturas y la de los egresados, que próximamente se pondrán en conocimiento de la comunidad científica. Con el estudio completo, será posible establecer los recursos adecuados para trabajar y evaluar el grado de consecución cada una de estas competencias y llevar a cabo una mejor coordinación entre las asignaturas del Grado, en lo relativo al desarrollo de las competencias genéricas que se consideren importantes para estos titulados.

## Metodología

Para llevar a cabo la investigación se consultaron, en primer lugar, las Guías Docentes de todas las asignaturas de los tres Grados. Se tomaron datos acerca de cuáles de las competencias a analizar se incluían y cómo iban a ser tra-

bajadas y evaluadas. Los resultados fueron muy heterogéneos y en muchos de los casos confusos, puesto que, en algunas, o bien se incluían un número demasiado numeroso de éstas, imposible de ser trabajadas en una sola asignatura, o no mencionaban ningún método ni actividad para su trabajo y evaluación, o estos no tenían relación directa con el tipo de competencia.

Tabla 1. Competencias evaluadas en la encuesta realizada a los alumnos del Grado en CCAA.

Nº	COMPETENCIAS
1	Que los estudiantes hayan demostrado poseer y comprender conocimientos en un área de estudio que parte de la base de la educación secundaria general, y se suele encontrar a un nivel que, si bien se apoya en libros de texto avanzados, incluye también algunos aspectos que implican conocimientos procedentes de la vanguardia de su campo de estudio.
2	Que los estudiantes sepan aplicar sus conocimientos a su trabajo o vocación de una forma profesional y posean las competencias que suelen demostrarse por medio de la elaboración y defensa de argumentos y la resolución de problemas dentro de su área de estudio.
3	Que los estudiantes tengan la capacidad de reunir e interpretar datos relevantes (normalmente dentro de su área de estudio) para emitir juicios que incluyan una reflexión sobre temas relevantes de índole social, científica o ética.
4	Que los estudiantes puedan transmitir información, ideas, problemas y soluciones a un público tanto especializado como no especializado.
5	Que los estudiantes hayan desarrollado aquellas habilidades de aprendizaje necesarias para emprender estudios posteriores con un alto grado de autonomía.
6	Conocer el método científico y aplicarlo en la estructuración de un trabajo científico, incluyendo la búsqueda de referencias bibliográficas y la forma correcta de citarlas.
7	Trabajar de forma adecuada en el campo y/o el laboratorio, incluyendo el manejo de la instrumentación básica, seguridad, eliminación de residuos, en su caso, y registro anotado de actividades.
8	Manejar aplicaciones informáticas de análisis estadístico para experimentar y simular sobre problemas relacionados con la titulación.
9	Diseñar protocolos específicos de la disciplina.
10	Expresión oral y escrita.
11	Toma de decisiones.
12	Organizar y planificar el trabajo.
13	Utilizar internet como medio de comunicación y fuente de información.
14	Trabajar en equipo.
15	Creatividad.
16	Liderazgo.
17	Ser capaz de adaptarse a nuevas situaciones, tener iniciativa y espíritu emprendedor.
18	Capacidad de autoevaluación.

A continuación, se preguntó a los alumnos sobre su opinión acerca de estas competencias en las asignaturas que habían cursado en su Grado. Los datos

fueron recogidos mediante una encuesta que fue validada por dos expertos en el tema y que se distribuyó entre todos los alumnos del Grado. En dicha encuesta se preguntaba acerca de las competencias genéricas que figuran en la Memoria de Verificación de los Grados en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales de la Universidad de León. Para cada una de estas competencias se preguntaba si, según su opinión, había sido trabajada o no en la asignatura para la que estaban haciendo la encuesta; si había sido evaluada o no en esa asignatura y, en caso afirmativo, si lo había sido mediante presentación oral, trabajos escritos, examen o por otros medios. Debían de marcar su respuesta mediante cruces y, para este último caso, se pedía que indicaran, de forma libre, los otros medios a los que se referían.

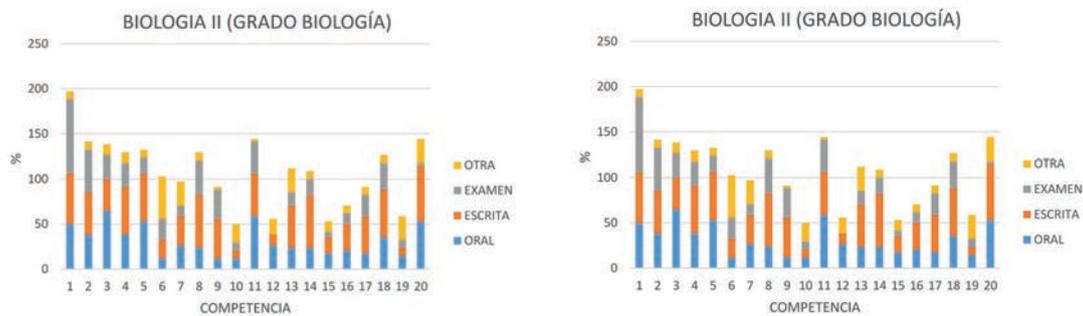


Figura 1. Ejemplos de cómo los alumnos consideran que ha sido evaluada cada competencia del Grado en Biología (mediante una presentación oral, trabajo escrito, un examen general y/o con otro método) para las asignaturas de Biología II (34 encuestas) y Zoología Fundamental (37 encuestas).

Para asegurar una muestra suficiente, las encuestas se hicieron de forma voluntaria, presencial, aunque anónima, y a los alumnos que la realizaban se les entregó un certificado de participación en el Proyecto para incentivar de algún modo su interés por realizar la encuesta. Se pidió que la rellenasen al finalizar alguna de las pruebas de evaluación de la primera convocatoria ordinaria, previamente seleccionadas por el número de alumnos, horario de realización y duración, para facilitar su participación. Cada ejemplar de la encuesta que se les entregaba correspondía con una asignatura del curso en el que el alumno estaba matriculado y debían elegir, cada uno de ellos, dos asignaturas de cada semestre, puesto que parecía un número adecuado al esfuerzo del alumno. Se recogieron un total de 504, 293 y 281 encuestas válidas de alumnos de todos los cursos, para los Grados en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales, respectivamente. Los datos fueron incluidos en una base de datos Excel y analizados estadísticamente mediante tablas dinámicas.

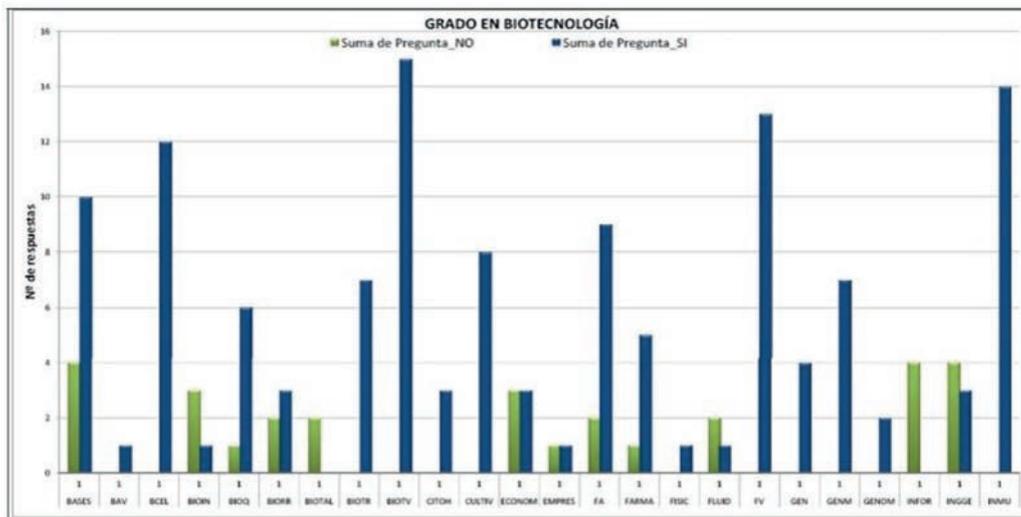


Figura 2. Ejemplo de gráfica elaborada a partir de las respuestas de los alumnos del Grado en Biotecnología, en relación de si una determinada competencia había sido o no trabajada en las distintas asignaturas.

### Conclusiones

Del análisis de los resultados y considerando solamente la opinión de los estudiantes, todas las competencias genéricas incluidas en las Memorias de Verificación de los Grados habrían sido trabajadas al finalizar los mismos. Sin embargo, llama la atención que hay un número importante de competencias que un número importante de alumnos opina que no se han trabajado en ninguna asignatura, o la opinión se encuentra muy dividida. Esta disparidad de opiniones podría ser debida a muchos factores que podrán ser aclaradas comparando estos datos con los obtenidos de la opinión de los profesores y los egresados. Por el contrario, se estima que deben suponerse como verdaderamente trabajadas, aquellas competencias que todos los alumnos consideran que lo han sido, tomando con ciertas reservas aquellas respuestas que corresponden a asignaturas para las que existen pocas encuestas válidas.

Por el contrario, hay un número, aunque pequeño, de asignaturas donde el 100 por 100 de los alumnos considera que no se han trabajado ni evaluado ninguna de las competencias genéricas de su Memoria de verificación.

Las competencias que los alumnos en general piensan que se han trabajado menos en los tres Grados son las relacionadas con liderazgo, la adaptación a nuevas situaciones, iniciativa, espíritu emprendedor y creatividad. En menor medida, manejar aplicaciones informáticas de análisis estadístico para experimentar y simular sobre problemas relacionados con la titulación, capacidad de autoevaluación o diseñar protocolos específicos de la disciplina.

Las que se aprecian como más trabajadas y evaluadas, son las relacionadas con poseer y comprender conocimientos básicos y especializados, aplicar sus conocimientos a su trabajo de forma profesional, interpretar datos y emitir juicios, transmitir información, adquirir habilidades de aprendizaje autónomo, expresión oral y escrita, trabajar de forma adecuada en un laboratorio, análisis y síntesis y organizar y planificar el trabajo.

En cuanto a “otros métodos de evaluación”, epígrafe que figuraba en las encuestas a los alumnos, una gran parte de los encuestados considera que muchas de las competencias son evaluadas mayoritariamente mediante distintos tipos de prácticas de laboratorio y de campo, y otras actividades asociadas a ellas, seguidas por trabajo autónomo del alumno y realización de trabajos, individuales o en grupo.

De manera no proyectada, se ha podido comprobar por las respuestas en el apartado “observaciones” de la encuesta, que la mayoría de los alumnos poseen información poco precisa de lo que es una competencia, su trabajo y evaluación, confundiendo ambos términos, y, mucho menos, están seguros de sí la han adquirido o no. Esto también puede estar indicando en alguna de las respuestas sobre los métodos de evaluación que señalan para alguna de las competencias. Esto revela que es necesario proporcionarles información detalladas sobre qué es una competencia, así como su trabajo y evaluación.

Se desconocen en el momento actual otros trabajos que hayan analizado las competencias genéricas bajo el prisma que en este trabajo se ha hecho, aunque sí existen varios que se ocupan de analizar diferentes aspectos de estas competencias, algunos de los cuales se han comentado al principio de este artículo.

Se asume que un análisis del tipo del que se está llevando a cabo es necesario para evaluar y mejorar la implantación de los Grados. En el GID COMBIO de la Universidad de León se ha iniciado un estudio que está previsto concluir próximamente. La metodología utilizada en este estudio es perfectamente transferible a otros Grados de ésta y otras universidades.

### Agradecimientos

Estos estudios han sido posibles gracias a la financiación de la Escuela de Formación de la Universidad de León.

### Bibliografía

Aguado, D., González, A., Antúnez, M. y de Dios, T. 2017. Evaluación de Competencias Transversales en Universitarios. Propiedades Psicométricas Iniciales del Cuestionario de Competencias Transversales. *Revista Iberoamericana sobre Calidad, Eficacia y Cambio en Educación* 15(2): 129-152

- Baños, J.E. y Pérez, J. 2005. Cómo fomentar las competencias transversales en los estudios de Ciencias de la Salud: una propuesta de actividades. *Educación Médica* 8(4): 216-225
- Calvo, A.I., Alfaro, E., Vega, A., Alonso Redondo, R., Castro, A. y García González, M.E. 2017. *Propuesta de mejora del procedimiento de evaluación de las competencias generales y transversales del grado de biotecnología de la Universidad de León*. Infancia, Educación y Aprendizaje (IEYA). Vol. 3, Nº 2 (edición especial), pp. 749-758. ISSN: 0719-6202. <http://revistas.uv.cl/index.php/IEYA/index>
- Calvo, A.I., Castro, A., Alonso-Redondo, R., Vega Maray, A. y García-González, M.E. in REDINE (ed.). 2019. *Métodos de evaluación de las competencias genéricas en el Grado en Biología de la Universidad de León, bajo el prisma del alumnado*. Conference Proceedings EDUNOVATIC 2018. Eindhoven, NL: Adaya Press. 616-617. ISBN 978-94-92805-08-9
- García, M.J., Terrón, M.J. y Blanco, Y. 2010. Desarrollo de recursos docentes para la evaluación de competencias genéricas. *ReVisión* 3(3):17-36
- Martínez Clares, P. y González Morga, N. 2018. Las competencias transversales en la universidad: propiedades psicométricas de un cuestionario. *Educación XXI* 21(1): 231-262
- Miró, J. y Jaume i Capó, A. 2011. Repositorio de actividades para enseñar competencias transversales. *Red U. Revista de Docencia Universitaria* 8(1): 101-110
- Pérez, J.E., García, J. y Sierra, A. 2013. Desarrollo y evaluación de competencias genéricas en los títulos de Grado. *Red U. Revista de Docencia Universitaria* 1:175-196
- Quintana, M., Raccoursier, S., Sánchez, A., Sidler, H. y Toirkens, J. 2007. Competencias transversales para el aprendizaje en estudiantes universitarios. *Revista Iberoamericana de Educación* 44:1-6
- Real Decreto 1027/2011, de 15 de julio, por el que se establece el Marco Español de Cualificaciones para la Educación Superior. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 3 de agosto de 2011, núm. 185, pp. 87912-87918
- Real Decreto 1393/2007, de 29 de octubre, por el que se establece la ordenación de las enseñanzas oficiales. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 30 de octubre de 2007, núm. 260, pp. 44037-44048
- Real Decreto 43/2015, de 2 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 1393/2007, de 29 de octubre, por el que se establece la ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales, y el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 3 de febrero de 2015, núm. 29, pp. 8088-8091
- Real Decreto 861/2010, de 2 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 1393/2007, de 29 de octubre, por el que se establece la ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 3 de julio de 2010, núm. 161, pp. 58454-58468
- Real Decreto 96/2014, de 14 de febrero, por el que se modifican los Reales Decretos

- 1027/2011, de 15 de julio, por el que se establece el Marco Español de Cualificaciones para la Educación Superior (MECES), y 1393/2007, de 29 de octubre, por el que se establece la ordenación de las enseñanzas uni-versitarias oficiales. *Boletín Oficial del Estado*. Madrid, 5 de marzo de 2015, núm. 55, pp. 20151-20154
- Rodríguez, M.L. 2006. De la evaluación a la formación de competencias genéricas: aproximación a un modelo. *Revista brasileira de orientação profissional* 7(2):33-48
- Sabariego, M. 2015. La evaluación de competencias transversales a través de las rúbricas. *@tic revista d'innovació educativa* 14: 50-58
- Tobón, S., Pimienta, J.H. y García, G.A. 2010. Aprendizaje y evaluación de competencias. Nueva Jersey: Prentice Hall Pearson
- Tuning América Latina. 2007. Reflexiones y perspectivas de la educación superior en América Latina (Informe final Proyecto Tuning-América Latina 2004-2007). Recuperado de [http://tuningacademy.org/wp-content/uploads/2014/02/TuningLAIIFinal-Report\\_SP.pdf](http://tuningacademy.org/wp-content/uploads/2014/02/TuningLAIIFinal-Report_SP.pdf)
- Valero, M., Aramburu, J., Baños, J.E., Sentí, M. y Pérez, J. 2007. Introducción de un portafolio para fomentar competencias transversales de los estudiantes universitarios. *Educación Médica* 10(4): 244-251
- Vega Maray, A., Castro, A., Alonso-Redondo, R., Calvo, A.I. y García-González, M.E. in REDINE (Ed.). 2019a. *Métodos de evaluación de las competencias genéricas en el Grado en Ciencias Ambientales de la Universidad de León, bajo el prisma del alumnado*. Conference Proceedings EDUNOVATIC 2018. Eindhoven, NL: Adaya Press. 618-619. ISBN 978-94-92805-08-9
- Vega Maray, A., Castro, A., Alonso-Redondo, R., Calvo, A.I. & García-González, M.E. in Pérez-Aldeguer, S., y Akombo, D. (Eds.). 2019b. Las competencias genéricas en el Grado en Ciencias Ambientales de la Universidad de León bajo el prisma del alumnado. Research, technology and best practices in Education. Eindhoven, NL: Adaya Press. 50-63. ISBN 978-94-92805-09-6
- Velasco, P.J., Rodríguez, R.M., Terrón, M. J. y García, M.J. 2012. La coordinación del profesorado universitario: un elemento clave para la evaluación por competencias. *Red U. Revista de Docencia Universitaria* 10(3): 265-284
- Villa, A. y Poblete, M. 2011. Evaluación de competencias genéricas: Principios, oportunidades y limitaciones. *Bordón* 63: 147-170
- Villarroel, V. y Bruna, D. 2014. Reflexiones en torno a las competencias genéricas en educación superior: Un desafío pendiente. *Psicoperspectivas* 13(1): 23-34
- Vive Búa, M., Fernández López, S., Lado Sestayo, R. y Otero González, L. 2015. ¿Cómo mejorar la asimilación de los contenidos teóricos por parte del alumnado universitario? Una aplicación del one minute paper en Contabilidad. *Revista Iberoamericana sobre Calidad, Eficacia y Cambio en Educación* 13(2): 67-84



### Grupo de Innovación Docente COMBIO

Los miembros del grupo han cambiado a lo largo de su historia, y estos han sido los siguientes. En negrita figuran los permanentes: E. Alfaro Saiz, R. Alonso-Redondo, A. Amez Florez, A. I. Calvo Gordaliza, A. Castro Izquierdo, C. Fernández Aláez, M<sup>a</sup> C. García González, M. E. García-González, M<sup>a</sup> A. Miguélez González, C. Polanco De La Puente, F. J. Rúa Aller, A. San Juan Peñín, F. Vaquero Rodrigo y A. Vega Maray. Colaboradores: J. L. Acebes Arranz y P. García Angulo.

## DE TODO UN POCO

La Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales (FCCBA) de la Universidad de León ha continuado durante este curso su actividad académica y además ha organizado numerosos eventos para promover la cultura y la formación en el ámbito científico desde una perspectiva tanto de actuación profesional como divulgativa. Este año 2019 nuestra facultad aparece por tercer año consecutivo entre los mejores centros de España para cursar Biotecnología (cuarto mejor centro) y Biología (quinto mejor centro) según el ranking de universidades españolas publicado por El Mundo, por lo cual nos felicitamos.

### Jornadas, congresos y conferencias

Queremos destacar la celebración de las I Jornadas Ibéricas de Genética y Biotecnología los días 14 a 17 de marzo, organizadas por la Coordinadora del Grado en Biotecnología, Dr.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> Luz Centeno, junto con otros profesores de las áreas de Fisiología Vegetal y de Genética, equipo decanal y Asociación ABLE en colaboración con la portuguesa Universidad de Tras-Os-Montes e Alto Douro (UTAD). Estas Jornadas fueron programadas con el objetivo de favorecer el contacto de los estudiantes de grados relacionados con Ciencias de la Vida de ambas universidades. Con la participación de más de 80 alumnos de ambos países, el congreso contó con sesiones de pósteres y comunicaciones orales, conferencias y diversas actividades científico-culturales (**Fig. 1**). Entre los conferenciantes destacamos la presencia de Luisa Amoedo, directora de mAbxience, David Álvarez Ordás, presidente de FFEBiotec, y Roberto Fernández González, investigador de Bioges Starters.



**Figura 1. A)** Celebración de las I Jornadas Ibéricas de Genética y Biotecnología en el Aula Magna de la Facultad; **B)** Entrega del diploma a la mejor presentación oral realizada por estudiantes del Grado en Biotecnología.

Como en años anteriores se celebraron las Jornadas de Orientación Profesional 2019, dirigidas a los estudiantes de último curso de los grados que se imparten en la Facultad así como a los alumnos de máster, en las que participaron la Fundación General de la Universidad de León y de la Empresa (FGULEM), así como distintas asociaciones y empresas.

La Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales fue la anfitriona de la 68º Reunión de la Conferencia Española de Decanos de Biología durante los días 21 al 23 de marzo, en la que se debatió sobre las nuevas experiencias académicas, organizativas y didácticas que cada día se ponen en marcha en la formación de los biólogos, y se trataron temas monográficos sobre las competencias específicas de los titulados en el Grado en Biología y los avances hacia una enseñanza activa, colaborativa y basada en evidencias.

La Asociación de Biotecnólogos de León organizó en la Fundación Sierra Pambley durante el mes de marzo, el ciclo de conferencias divulgativas ConCiencia, sobre temas científicos impartidas por docentes e investigadores de prestigio. En colaboración con el Vicerrectorado de Responsabilidad Social, Cultura y Deportes de la ULE, organizó también el concurso de fotografía “Mujer y Ciencia”.

Del 20 al 22 de mayo se celebró la quinta edición del festival internacional de divulgación científica “Pint of Science 2019”, con charlas y debates en bares del centro de León, en las que participaron investigadores y profesores de nuestra Facultad que acercaron a la sociedad leonesa temas científicos de gran interés como las alergias, aves altruistas, biodiversidad, contaminación atmosférica y antropología física, entre otros.

Gran éxito tuvo la celebración el 18 de mayo del “V Día Internacional de la Fascinación por las Plantas (FoPD 2019)” que organiza la European Plant Science Organization (EPSO) para recordar la importancia que la investigación de las plantas tiene para la sociedad. La Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales participó en este evento con un extenso programa de actividades que incluía charlas, talleres, experimentos, concurso de fotografía, mini-congreso, y otras actividades orientadas a estudiantes universitarios, estudiantes de educación primaria y secundaria y público en general. Estas actividades fueron organizadas y coordinadas por profesores de las Áreas de Botánica y de Fisiología Vegetal (José Luis Acebes, Carmen Acedo, Estrella Alfaro, Raquel Alonso, M.<sup>a</sup> Luz Centeno, Antonio Encina, Penélope García y Marta Eva García) y participaron estudiantes de los grados en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales. Podemos mencionar, entre otras actividades, las “Jornadas de Biotecnología Vegetal”, las “VI Jornadas de Gestión de Flora”, el “III Concurso de Fotografía de la

ULE Fascinación por las plantas” (**Fig. 2**), los talleres “Experimentos Fascinantes con Plantas” y las conferencias *¿Cómo se defienden las plantas de sus enemigos?* impartida por Penélope García e *Importancia de las colecciones naturales en estudios profesionales de gestión de flora y otras disciplinas botánicas* por Estrella Alfaro y Marta Eva García.



**Figura 2.** Fotos ganadoras del III concurso de fotografía “Fascinación por las plantas”.

Un año más, la Asociación de Biotecnólogos de León (ABLE) en colaboración con la Federación Española de Biotecnólogos (FEBBiotec) organizó durante el mes de octubre un ciclo de charlas de divulgación científica en el centro de León bajo el título “Con Ciencia, té”. En esta iniciativa son los estudiantes de grado, máster y doctorado los que imparten ponencias con el objetivo de abrir la biotecnología a la sociedad, como entre otras: *Bovinos como biorreactores*, *No todo está en los genes*, *Seda de araña y sus aplicaciones en biomedicina e industria*, *Tu microbiota se pone en forma y Bacterias a favor del medio ambiente*.

Entre las muchas conferencias impartidas durante este año en la Facultad mencionaremos las siguientes: *Animales raros y cómo encontrarlos* organizada por ACALE el 25 de febrero, *Antártida, un velero entre gigantes* el 27 de marzo; *El lobo en Castilla y León. Población, tendencias y conflicto*, impartida por el biólogo Mario Sáenz de Buruaga el 10 de mayo; *Mascotismo y redes sociales. La tragedia de lo salvaje*, impartida por Alexander Carro el 13 de noviembre. También se presentaron documentales de gran interés como *Valle de lobos* el 28 de octubre. Este trabajo está desarrollado por la empresa leonesa Más que pájaros, Verkami, Al Rojo Productora, AV Develops y Territorio Salvaje.

### Cursos y talleres

Durante el mes de marzo se impartieron diversos talleres como el taller

fotográfico “Proyecto interior” y el taller de “Creación de ecosferas: Ecosistemas autosostenibles”, este último organizado por ACALE y patrocinado por la FCCBA y la ULE.

También en este mes, del 19 al 28, se celebró la “Semana Verde” de la ULE con el objetivo de sensibilizar al público sobre la necesidad de poner en práctica un consumo responsable. La FCCBA colaboró con la impartición de talleres como el de “Aprovechamiento de plantas terapéuticas”, “El sucio negocio de la limpieza. Alternativas ecológicas y solidarias” y una sesión sobre reciclaje de restos orgánicos y autocompostaje.

Fue activa también la participación de la Facultad en las “Jornadas de Puertas Abiertas” de la ULE, celebradas en abril, en las que se ofrecieron a los estudiantes de secundaria charlas, visitas guiadas y talleres, como el taller de Biología Molecular y la visita a las Colecciones Zoológicas.

El 13 de noviembre se celebró el “Día del SIG”, en el que se impartieron diversos talleres con actividades prácticas organizados por las áreas de Geodinámica y de Ingeniería Cartográfica, Geodésica y Fotogrametría con la colaboración de VEXIZA, TECNOSYLVA y SMART RURAL.

Como en años anteriores, la Biblioteca de la Facultad organizó los “Cursos sobre el gestor bibliográfico Mendeley” destinados a alumnos de 4.º curso de todos los grados impartidos en la Facultad.

Además, la Facultad acogió o estuvo implicada en diversos cursos de extensión universitaria y de verano como: *Introducción a QGIS en proyectos medioambientales* bajo la dirección de Montserrat Ferrer, y *Biología de la conservación de flora y fauna en la cordillera Cantábrica*, dirigido por Marta Eva García y Raquel Alonso.

Un año más nuestra Facultad participó en la organización de la XV edición del “Curso de Actualidad Científica y Cultural” patrocinado por la Fundación Carolina Rodríguez y coordinado por el Dr. Félix Busto, Vicedecano 1.º de la Facultad. Se celebró entre los días 16 de octubre y 25 de noviembre, con temas muy variados y de gran interés para la sociedad. Las conferencias fueron las siguientes: *Pablo Neruda en Miguel Hernández y Miguel Hernández en Pablo Neruda* por José María Balcells Domenech (Universidad de León); *¿Será alergia? (Sobre las dificultades en el diagnóstico y últimos avances)* por Alicia Armentia Medina (Universidad de Valladolid); *Agricultura: Producción de alimentos y medio ambiente* por Pedro María Aparicio Tejo (Universidad Pública de Navarra); *La ficción y los límites de la Ciencia* por Luis Salvador López Herrero; *El origen de la vida en la Tierra ¿o fuera de ella?* por Carlos Briones Llorente (Centro de As-

trobiología, CSIC); *Nanoseguridad: Impacto de la nanotecnología en la salud y en el medio ambiente* por Paloma Morales Gómez (Universidad Complutense de Madrid); *El Fuero de León (1917). El derecho de la Ciudad Regia hace mil años* por Emiliano González Díez (Universidad de Burgos); *El “idiota espabilado”: ¿hacia la destrucción de Gaia?* por Javier Arístegui Ruiz (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria); *Impacto del cambio climático sobre los riesgos naturales* por M.<sup>a</sup> del Carmen Llasat Botija (Universidad de Barcelona); *Una mirada a la historia del Museo del Prado* por Javier Portús Pérez (Museo Nacional del Prado); *Iniciativas científicas para el retorno al rural. Algunos ejemplos de éxito* por M.<sup>a</sup> del Carmen Martínez Rodríguez (Misión Biológica de Galicia, CSIC); *Hombre y animales: Una historia compartida* por Joaquín Sánchez de Lollano Prieto (Universidad Complutense de Madrid).

### **Innovación docente y otras actividades**

Continuamos nuestra labor en el ámbito de la Innovación Docente, en la que destacamos este año el proyecto docente *Desarrollo de competencias profesionales 6C en los estudiantes de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales mediante la divulgación de la enseñanza de las ciencias a la sociedad* llevado a cabo por el grupo de innovación docente BIOMETAC con participación de profesores de múltiples áreas de conocimiento: Biología Celular, Bioquímica y Biología Molecular, Botánica, Ecología, Física Aplicada, Fisiología, Genética, Geodinámica Externa y Paleontología, Microbiología, Producción Animal; Nutrición y Bromatología y Zoolología.

Otras actividades a destacar fueron las siguientes:

En marzo, más de sesenta niños de entre 6 y 12 años participaron en la segunda edición del “Carnaval de la Biodiversidad” organizado por el Vicerrectorado de Responsabilidad Social, Cultura y Deportes de la Universidad en colaboración con la Facultad. El objetivo de esta iniciativa es facilitar la conciliación familiar y laboral de los trabajadores de la comunidad universitaria, a través de una perspectiva educativa sobre el entorno natural. Conocer los pasos del método científico, ver los peces que viven en los ríos de nuestra provincia, elaborar nidos, descubrir el mundo de las lechuzas y deshacer egagrópilas fueron algunas de las actividades que los niños realizaron.

El 22 de marzo se entregaron en nuestra facultad los premios de la fase autonómica de la XIV Olimpiada de Biología así como de la fase local de la XXX Olimpiada de Física y la XXXII Olimpiada de Química, organizadas por la ULE. En este acto, José Antonio Quirce (COBCYL) ofreció una conferencia titulada *¡Biología increíble!*

El 10 de abril, 75 alumnos de 3º de Educación Primaria asistieron en nues-

tra Facultad a la “Semana de Acción Mundial por la Educación”, una campaña organizada por la Fundación Entreculturas que viene realizándose a nivel mundial desde 2001 en 124 países para trabajar por garantizar el derecho a la educación. En este acto, el Decano Dr. Antonio Laborda leyó el manifiesto “Defendemos la educación, sostenemos el mundo” en el que se reivindicó que la sostenibilidad medioambiental y social han de estar unidas frente al cambio climático. Los niños han participado en distintos talleres que finalizaron con una plantación de semillas.

El 12 de mayo se celebró en León el proyecto “Geolodía 2019”, con una actividad denominada “Paseo geológico por La Candamia. Un lugar donde la geología y la historia se dan la mano”, que consistió en recorrido guiado por este terreno para conocer su origen y evolución. La actividad fue organizada por la Sociedad Geológica de España (SGE) con el apoyo de varias instituciones y entidades, entre las que se encuentra la Universidad de León a través del Grupo 'Q-Geo' que coordina la profesora Esperanza Fernández. Los Geolodías pretenden acercar a la sociedad tanto la Geología como la profesión del geólogo.

Por primera se celebró en León el “Campus Científico de Verano” organizado por la FECYT y los Ministerios de Educación y Formación Profesional junto al de Ciencia, Innovación y Universidades (**Fig. 3**). Así, durante el mes de julio, la FCCBA junto a la de Veterinaria acogieron a alumnos de bachillerato y secundaria de distintos puntos de España que trabajaron en proyectos de acercamiento científico relacionados con la Biotecnología, la Fisiología y la Ciencia y Tecnología de los Alimentos. “Cocinar con ciencia”, “Descubre los secretos del cáncer”, “Cuando dejamos de estar verdes... salimos al mercado. El proceso de



**Figura 3.** Participantes en el Campus Científico de Verano.

maduración” y “Descubriendo el apasionante mundo de las abejas” fueron los talleres impartidos en esta actividad (**Fig. 4**).



**Figura 4.** Talleres del Campus Científico de Verano. **A)** Taller de fisiología vegetal; **B)** Taller de botánica.

Los profesores de la FCCBA se sumaron a otras iniciativas como el proyecto STEM Talent Girl que fomenta las vocaciones científico-técnicas en la población femenina, las actividades del programa Mujer y Niña en la Ciencia, con charlas y talleres, celebrado en febrero con el objetivo de dar visibilidad al quehacer científico en la ULE y transferir conocimiento a las jóvenes de educación secundaria, y las microcharlas de la Noche Europea de los Investigadores del 27 de septiembre.

### **Fiesta de San Alberto Magno**

El 15 de noviembre de 2019 celebramos en el Aula Magna San Isidoro el solemne acto académico de nuestra Fiesta de San Alberto Magno (**Fig. 5**). Este acto fue presidido por el Rector Magnífico D. Juan Francisco García Marín, el Decano D. Antonio Laborda Navia y el Presidente del Consejo Social de la ULE, D. Javier Cepedano Valdeón. El profesor Dr. José Antonio Gil Santos, Catedrático-



**Figura 5.** Celebración de la Festividad de San Alberto Magno 2019.

tico de Microbiología, pronunció una interesante conferencia titulada *Las balas mágicas: efectos colaterales*, en la que explicó las estrategias que los seres humanos han desarrollado a lo largo de la historia en su lucha contra las enfermedades infecciosas. Se impusieron las insignias a los nuevos graduados en Biología, Biotecnología y Ciencias Ambientales, y se entregaron las distinciones a los alumnos de máster de la Facultad. Además, se anunciaron los premios anuales 'DSM-Vitatene Awards for Academic Excellence' para el mejor expediente de Biotecnología que correspondió a Hugo Alonso Olivares (**Fig. 6**), accésit para



**Figura 6.** D. Hugo Alonso Olivares recoge el reconocimiento *DSM-Vitatene Awards for Academic Excellence* al mejor expediente del grado en Biotecnología.

Carla Pérez Villanueva, y el 'Premio Fin de Carrera Chemo León Farma' al mejor expediente de Biología que correspondió a David García Gutiérrez (**Fig. 7A**). Además, el Ilustre Colegio de Economistas de León hizo entrega de un reconocimiento al mejor expediente del grado en Ciencias Ambientales, que correspondió a Noemí López Alonso (**Fig. 7B**). En este acto también se entregaron las distinciones honoríficas por su jubilación a Dña. Dolores Prieto, miembro del PAS, y al profesor D. Ángel Penas Merino, Catedrático del Área de Botánica.



**Figura 7. A)** D. David García Gutiérrez recoge el Premio Fin de Carrera Chemo León Farma al mejor expediente del grado en Biología. **B)** Dña. Noemí López Alonso recoge el reconocimiento otorgado por el Ilustre Colegio de Economistas de León al mejor expediente del grado en Ciencias Ambientales.

Si tienes alguna sugerencia o quieres enviarnos tus artículos, tu proyecto de tesis o alguna fotografía para la portada, ponte en contacto con nosotros:

[ambiociencias@unileon.es](mailto:ambiociencias@unileon.es)

La edición electrónica de la revista se puede consultar en:

<http://centros.unileon.es/biologia/ambiociencias1/>



Ambio ciencias



REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA E INNOVACIÓN DOCENTE

En contraportada: logotipo diseñado por el Dr. Estanislao de Luis Calabuig como anuncio del quincuagésimo aniversario de los estudios de Biología en León.



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES. UNIVERSIDAD DE LEÓN