

UN NUEVO HORIZONTE PARA MEDICIONES BIOLÓGICAS PRECISAS Y DE ALTA EXACTITUD

A NEW HORIZON FOR PRECISE AND HIGH ACCURACY BIOLOGICAL MEASUREMENTS

B. Tenaglia Giunta^{*1,2} y **R. Napán**¹

¹*Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) - Metrología Física - Departamento de Termodinámica
Av. General Paz 5445 - (B1650WAB) San Martín - Buenos Aires - Argentina*

²*Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), Campus Migueletes - Av. 25 de mayo y Francia
(B1650) San Martín - Buenos Aires - Argentina*

Recibido: 07/07/2022; Aceptado: 15/03/2023

Pensar en la metrología como parte de la biotecnología puede resultar inimaginable. Sin embargo, en los últimos 25 años un grupo de científicos han estado trabajando en ello, y un nuevo concepto está ganando popularidad entre la comunidad científica: la biometrología. Por esa razón, esta publicación, pretende acercar al lector los antecedentes científicos sobre la ciencia de las mediciones aplicada a la biotecnología. Se hará una breve introducción del tema abordándolo con ejemplos de sus diferentes aplicaciones para finalizar con la presentación de una definición enfocada en las ciencias de la vida.

Palabras Clave: biometrología, metrología, biotecnología, magnitud, exactitud.

Thinking of metrology as part of biotechnology can be unimaginable. However, in the last 25 years a group of scientists have been working on it and a new concept is gaining popularity among the scientific community: biometrology. For this reason, this publication aims to bring the reader closer to the scientific background on the science of measurements applied to biotechnology. A brief introduction to the topic will be made, addressing it with examples of its different applications to end with the presentation of a definition focused on the life sciences.

Keywords: biometrology, metrology, biotechnology, quantity, accuracy.

<https://doi.org/10.31527/analesafa.2023.34.2.46>



ISSN 1850-1168 (online)

I. INTRODUCCIÓN

Diariamente, convivimos con las siete magnitudes base y sus derivadas, que conforman el Sistema Internacional de Unidades (SI) y al mismo tiempo coexistimos con la biotecnología. Por citar algunos ejemplos, la biotecnología es la responsable que un bioquímico tenga disponible diversos biomarcadores para determinar un diagnóstico médico, que se pueda llevar adelante un protocolo de RT-PCR o que se cuenten con una diversidad de kits para el testeo rápido de aquellos que presenten síntomas compatibles con el COVID-19, que las personas puedan revelar su identidad en caso de desconocerla, que podamos tener una vacuna contra el SARS-CoV-2, entre otros. Entonces, ¿Qué relación tiene la metrología con la biotecnología? ¿Somos conscientes de la importancia de la metrología en la biotecnología y viceversa?

II. DE LA METROLOGÍA FUNDAMENTAL A LA BIOMETROLOGÍA

La humanidad siempre ha necesitado medir para poder evolucionar y los primeros registros del oficio de medir remontan desde los orígenes de las civilizaciones. En la Tabla 1 se resumen los principales hitos de la historia de la metrología. El último gran acontecimiento transcurrió el 20 de

mayo del 2019 con la redefinición del SI.

El avance de la biología molecular y la genética durante la segunda mitad del siglo XX ha permitido el desarrollo de técnicas de ingeniería genética que conllevaron a la creación de uno de los recursos esenciales en los proyectos de investigación biotecnológica: los organismos genéticamente modificados (OGM). El conjunto de todas esas tecnologías constituye el núcleo de la biotecnología contemporánea. Sus aplicaciones más destacadas incluyen: el aislamiento e identificación de genes, tecnologías para su manipulación y conservación, y todas aquellas que permiten la creación de nuevos genes. Sin embargo, nada de esto hubiese sido posible sin el descubrimiento de la estructura doble helicoidal del ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN es la molécula responsable de almacenar nuestra información genética y su estructura fue resuelta por Watson y Crick en 1953. Esta revelación fue clave en el desarrollo posterior de toda la colección de técnicas disponibles utilizadas por científicos de todo el mundo. Entre ellas tenemos las tecnologías del ADN recombinante en 1973. El perfeccionamiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación exponencial del ADN, presentada por Mullis en 1984. La clonación de la oveja Dolly en 1996, entre otras.

Durante la vigésima CGPM en 1995, la bioquímica Mariane Grunberg-Manago brindó un discurso sobre la impor-

* btenaglia@inti.gob.ar

TABLA 1: Principales acontecimientos históricos de la metrología.

Año	Acontecimiento
1600 a.C.	Hallazgos arqueológicos demostraron que China contaba con un sistema métrico decimal propio [1].
1789	Revolución Francesa: se definió el metro y el kilogramo [1].
1875	Se firmó la Convención del Metro y se creó el Bureau Internacional de Pesas y Medidas (BIPM). Además, se convocó a un encuentro cada 4 años en la Conferencia General de Pesas y Medidas (CGPM) y quedó consolidado un Comité Internacional de Pesas y Medidas (CIPM) [2].
1927	Creación de Comités Consultivos (CC) especializados [3].
1960	1° CGPM SI conformado por las 6 unidades: segundo, kilogramo, metro, kelvin, ampere y candela [4].
1971	Incorporación de la última unidad básica del SI: el mol [4].
1990	CIPM comenzó a investigar la viabilidad de las actividades significativas de metrología química [4].
1993	Creación del Comité Consultivo de Cantidad de Sustancia (CCQM) [4].
2000	Metrólogos cuestionaban la credibilidad de los resultados de investigaciones sobre las tecnologías del ADN recombinante. Se creó el Grupo de Trabajo de Bio-Análisis (BAWG) [4].
2014	División del BAWG y creación de 3 nuevos grupos de trabajo: de Análisis de Ácidos Nucleicos (NAWG), de Análisis de Proteínas (PAWG) y de Análisis de Células (CAWG) [4].
2018	2 6° CGPM Redefinición del SI en términos de constantes universales de la naturaleza [4].
2019	Redefinición del SI. Nueva definición del mol [5].

tancia de las mediciones en sus investigaciones. Allí describió brevemente la genética humana y cómo ha sido posible la identificación de algunos genes, responsables de enfermedades genéticas, mediante el mapeo del genoma humano. Ante una comunidad que quizás nunca había imaginado la posibilidad de medir fragmentos de ADN, finalizó el discurso con las siguientes palabras:

“He tratado de mostrarles como la biología molecular necesita la disciplina de la metrología a la que ustedes mismos están apegados. Durante esta semana, perfeccionarán este arte que es de ustedes” [6].

Estas palabras fueron disparadores para muchos metrologos que tomaron consciencia de la importancia de aplicar metrología en biotecnología. Y, además, marcó el nacimiento de lo que hoy podríamos denominar la biometrología. Una nueva ciencia donde dos disciplinas se empezaban fusionar, quedando demostrado que las ciencias de las mediciones iban más allá de la física y la química.

El crecimiento de la biotecnología en la salud, la producción de alimentos, la medicina forense y la protección del medio ambiente inició un debate en la vigésimo primera CGPM en 1999. Allí concluyeron que era necesario contar con un sistema metroológico adecuado [7]. Finalmente, en el sexto encuentro del CCQM, se logró la formación del grupo de trabajo ad-hoc de bioanálisis (BAWG) [8]. Se propuso el desarrollo y mantenimiento de una estructura de mediciones críticas y patrones para apoyar a la industria biotecnológica. En 2003, se reunieron y definieron que la cuantificación de ADN era la primera línea de trabajo con los propósitos de mejorar la comparabilidad de esas mediciones y de determinar los factores que contribuyen a un resultado preciso y con su correspondiente valor de incertidumbre. El primer estudio se enfocó en la PCR cuantitativa (qPCR) y luego le siguieron otros [9].

Desde mediados de los 90, en que se abrió la discusión de la metrología en la biotecnología, los científicos han estado desarrollando sus proyectos buscando resolver aquellos problemas metroológicos que nadie antes había enfocado su atención. Han estado trabajando en “Biometrología”. Mientras tanto es importante destacar que actualmente el CAWG, PAWG y NAWG continúan trabajando con el propósito de:

“Desarrollar una infraestructura biometrológica que permita obtener resultados cada vez más precisos, reproducibles y con trazabilidad al SI [5]”.

Los inicios de la biometrología proceden desde fines de los años 90 y sería acertado citar a Helen Parkes quien cuestionaba la necesidad de una estructura metroológica en las mediciones aplicadas a las ciencias biológicas [10]. En varias ocasiones dejaba en claro que la falta de reproducibilidad de las mediciones era un asunto que no se podía pasar inadvertido y las publicaciones que se citan en la Tabla 2 avalan esta afirmación. En la actualidad, H. Parkes continúa aportando nuevos conocimientos a la comunidad científica, inspirando a las nuevas generaciones a seguir trabajando hacia un objetivo en común: la biometrología.

¿Será posible considerar metrología en biotecnología? ¿Es un horizonte inalcanzable en nuestros días? En el siglo pasado pareció ser una meta difícil de conseguir y muy pocas personas eran conscientes de la importancia de la metrología en la biotecnología. Pero, hoy ya es una realidad y aún queda mucho por trabajar.

III. MENSURANDOS BIOLÓGICOS Y MÉTODOS DE MEDICIÓN

¿Qué se puede medir? ¿Cuáles son los métodos que permiten la caracterización de los mensurandos biológicos? En todo proceso de medición, uno de los requerimientos esenciales es la definición del mensurando. Dentro de la biotecnología, podemos identificar tres grandes grupos: ácidos nucleicos, proteínas y entidades celulares. En la Tabla 3, se resumen algunos ejemplos y se listan los métodos comúnmente utilizados por la comunidad científica.

En los apartados anteriores se mencionó la palabra biometrología y en principio, podríamos definirla como la metrología aplicada a las ciencias de la vida. No obstante, la existencia de una amplia variedad de aplicaciones puede hacernos suponer que parecieran no estar relacionadas entre sí, pero, según los trabajos de H. Parkes, se identifica claramente una palabra en común: cuantificar (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, entre otros). A continuación, en la Tabla 4, se citan ejemplos. Es importante resaltar que la lista es infinita y solo nos centraremos en unos pocos, animando

TABLA 2: Los inicios de la Biometrología: Trabajos publicados por H. Parkes.

Año	Trabajos publicados
1995	Cuantificación de oligonucleótidos mediante hibridación ADN-ADN utilizando biosensores ópticos [11].
1996	Comparación y calificación de 6 métodos para la extracción rápida de ADN en tejidos vegetales [12].
1997	Sondas de oligonucleótidos específicas para la identificación de distintas especies de carnes en alimentos crudos y cocidos, mediante hibridación ADN - ADN [13]
2000	Creación del BAWG [8].
2001	Programa “Mediciones en Biotecnología” abrió el debate a la comunidad de las biociencias sobre los beneficios de aplicar conceptos metrológicos, como trazabilidad e incertidumbre y de contar con mediciones comparables [14].
2003	Inicio de los estudios piloto de PCR cuantitativa (qPCR) para estudiar los factores que contribuían la variabilidad de los resultados interlaboratorio. Trabajo realizado junto con miembros del BAWG [10].
2007 – 2010	Primera key comparison del BAWG. El objetivo: respaldar las capacidades de calibración y medición (CMC) para la determinación de ADN plasmídico en solución acuosa [15].
2008-2010	Estudio de la trazabilidad de biomoléculas y biomarcadores en la comparabilidad de mediciones efectuadas para la determinación de diagnósticos médicos [16].
2011	Publicación de un estudio sobre los servicios de medición y las necesidades de comparación para una infraestructura internacional para biociencias y biotecnología. Principalmente centradas para el sector salud por ser el área de mayor interés del BIPM [17].
2012 – 2015	Proyecto sobre metrología para el monitoreo de enfermedades infecciosas, resistencia microbiana y microorganismos perjudiciales [18].
2013 – 2016	Diseño de métodos para la cuantificación de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas y entidades celulares [19].
2018	Evaluación de la PCR digital (dPCR) como método de medición de referencia primario trazable al SI [20].
2019	Documento sobre los requerimientos necesarios para asegurar la calidad en las muestras de los pacientes en el contexto de la nueva regulación de diagnóstico in-vitro europeo que entrará en vigencia en mayo de 2022 [21].

al lector a continuar con la búsqueda de ellos.

IV. BIOMETROLOGÍA: UN NUEVO DESAFÍO PARA LOS METRÓLOGOS

Los metrólogos que se dedican a la metrología científica fundamental quizás no ven posible que la biotecnología pueda ser parte de su trabajo. Muchos tienden al desconocimiento de esta aplicación cuando la realidad es que en un laboratorio de biología molecular todo el tiempo se está midiendo y detrás de esas mediciones está la metrología.

La falta de reproducibilidad y repetibilidad son dos grandes inconvenientes que a menudo se observan cuando el mensurando que se quiere medir se trata de una molécula, una proteína o una célula. Allí es donde la biometrología viene a ocupar su lugar. Resultados que no son reproducibles, comúnmente suelen aparecer cuando se intenta reproducir experimentos que previamente fueron llevados a cabo por otros científicos o al repetir experimentos utilizando reactivos de distintos proveedores. Otras de las razones de gran importancia es la complejidad de los sistemas biológicos en el que intervienen una infinidad de interacciones que suelen ser susceptibles a cualquier variación del entorno. Entonces, es muy común pensar que es imposible aplicar conceptos metrológicos a los sistemas biológicos debido a la enorme cantidad de variantes que presentan. Sin embargo, hoy en día muchos grupos de investigación están dedicando todos sus esfuerzos para lograr una estandarización global que conlleve a producir resultados equivalentes [22]. Especialmente en mediciones en sistemas dinámicos, donde las rutas metabólicas son independientes, donde procesos sutiles de reconocimiento molecular e interacción están ocurriendo y la desnaturalización y modificaciones post traduccionales de las proteínas son posibles [23].

Hasta aquí hemos visto que la biometrología es una cien-

cia naciente, todavía queda mucho trabajo por delante. Por fortuna, cada vez son más los científicos toman conciencia de la importancia de los procesos de medición, de identificar las posibles fuentes de incertidumbre durante el proceso de medición, de la necesidad de contar con materiales de referencia certificados que nos brinden resultados trazables al SI en cualquier parte del mundo. Entonces, ¿qué es la biometrología? El 12 de abril de 2017, en la Massive Analysis and Quality Control Society Conference en los Estados Unidos, se presentó una definición que establece que la Biometrología es la ciencia de las biomediciones que permite la comparabilidad global de los resultados de medición bioanalítica de características biológicas, con trazabilidad a SI, unidad legal o acordada internacionalmente. Por último, ¿qué se puede cuantificar en biotecnología? En este momento, la respuesta llega hasta los límites que impone la tecnología existente. Sin embargo, la lista es interminable y este es el desafío por delante de la biometrología.

V. CONCLUSIONES

En los últimos años, la biotecnología se ha expandido en una diversidad de productos y servicios que aún continúan creciendo de manera exponencial. Los biometrólogos han estado sentando precedentes con investigaciones cuyas metas principales estaban enfocadas en la validación de las mediciones para la cuantificación de ADN, ARN, proteínas, entidades celulares, entre otros. Sin embargo, es importante destacar que esta nueva ciencia emergente: la biometrología, converge del conocimiento que las ciencias médicas, físicas, químicas fueron desarrollando a lo largo de la historia de la humanidad. Con este artículo se pretende mostrar que la metrología y la biotecnología son dos ciencias que trabajan de manera conjunta, afirmando que resta un largo camino por recorrer, investigar y sobre todo por mejorar.

Finalmente, el resultado de esta investigación nos lleva a

TABLA 3: Métodos de medición utilizados para mensurandos biológicos.

Mensurando	¿Qué se mide?	Ejemplos de métodos de medición
Ácidos Nucleicos	Secuencia de bases y longitud - Cantidad - Cuantificación	qPCR – dPCR. Espectroscopia UV-VIS, de fluorescencia. DNA Next-Generation sequencing (NGS). RAPD. RFLP
Proteínas	Secuencia de aminoácidos - Cantidad – Cuantificación - Longitud de péptidos y masa - Actividad enzimática, afinidad de anticuerpos, etc. - Estructura secundaria y terciaria	Espectroscopia UV-VIS, de fluorescencia, IR, de Raman. Dicroísmo circular. RMN. ELISA. FRET. Espectrometría de masas. Cristalografía de Rayos X. Electroforesis. Turbidimetría.
Células / Tejidos	Tipificación celular y tamaño - Cantidad – Cuantificación - Viabilidad y funcionalidad celular	Citometría de flujo. Cultivos. Cuantificación directa por microscopio. Turbidimetría

TABLA 4: Biometrología en diferentes campos de aplicación.

Área del conocimiento	Aplicaciones de la Biometrología
Medicina	Cuantificación de biomarcadores para la detección de enfermedades como por ejemplo Parkinson y Alzheimer [24]. Diagnóstico de mesotelioma pleural maligno [25].
Alimentos y Agricultura	Detección de organismos genéticamente modificados (OGM) [26]. Detección de soja genéticamente modificada por qPCR [27].
Desarrollo farmacéutico	Bioteología farmacéutica: biofármacos derivados de proteínas, ARN, hormonas, anticuerpos, entre otros [28]. Diseño de drogas, terapia génica, genómica, proteómica, monitoreo de bioprocesos, testeo de toxicidad [9].
Medio ambiente	Monitoreo de OGM en el aire [29]. Calidad del agua, monitoreo de la biodiversidad, biorremediación [9].
Análisis clínicos	Cuantificación de biomarcadores para diagnóstico de enfermedades [30]. Diagnóstico prenatal, monitoreo de enfermedades [14].
Bioterrorismo	Monitoreo de agentes de guerra biológica [14].
Asuntos legales	Exámenes de filiación, perfiles forenses [14].

pensar que la metrología es una ciencia que está presente pero invisible en el desarrollo de múltiples áreas de investigación. Atrás va quedando el paradigma de ciencias que “trabajan por separado” y se va abriendo la posibilidad de un nuevo paradigma: “ciencias básicas que se fusionan para ser ciencias multidisciplinarias” con un único fin: generar beneficios para todos.

REFERENCIAS

- [1] J. P. Fanton. A brief history of metrology: past, present, and future. *Int. J. Metrol. Qual. Eng.* **10**, 1-8 (2019).
- [2] BIPM. *The Metre Convention* <https://www.bipm.org/en/worldwide-metrology/metre-convention/>. Accedido: 2022-06-29.
- [3] BIPM. *34th meeting CIPM* <https://www.bipm.org/en/committees/ci/cipm/older-meeting-reports>. Accedido: 2022-06-29. 1927.
- [4] R. Kaarls. The Consultative Committee for Metrology in Chemistry and Biology. *J. Chem. Metrol.* **12**, 1-16 (2018).
- [5] BIPM. *The International System of Units (SI)* <https://www.bipm.org/en/publications/si-brochure>. Accedido: 2022-06-29.
- [6] BIPM. *20e CGPM* <https://www.bipm.org/en/committees/cg/cgpm/publications>. Accedido: 2022-06-29. 1995.
- [7] BIPM. *21e CGPM* <https://www.bipm.org/en/committees/cg/cgpm/publications>. Accedido: 2022-06-29. 1999.
- [8] BIPM. *CCQM 6th meeting* <https://www.bipm.org/en/committees/cc/ccqm/publications>. Accedido: 2022-06-29. 2000.
- [9] H. Parkes. Metrological Challenges in Bioanalysis. *Journal of Metrology Society of India* **19**, 971-202 (2004).
- [10] J. A. Shallcross, G. C. Saunders y H. C. Parkes. Validation of DNA technologies—the way forward. *Anal. Commun.* **33**, 347-348 (1996).
- [11] H. J. Watts, D. Yeung y H. Parkes. Real-time detection and quantification of DNA hybridization by an optical biosensor. *Anal. Chem.* **67**, 4283-4289 (1995).
- [12] H. J. Rogers, N. A. Burns y H. C. Parkes. Comparison of small-scale methods for the rapid extraction of plant DNA suitable for PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **14**, 170-183 (1996).
- [13] D. J. Hunt, H. C. Parkes e I. D. Lumley. Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes. *Food Chem.* **60**, 437-442 (1997).
- [14] H. Parkes. Measurement Challenges in Bioanalysis. *Aust. J. Chem.* **56**, 71-72 (2003).
- [15] S. L. R. Ellison, M. J. Holden, A. Woolford, et al. CCQM-K61: Quantitation of a linearised plasmid DNA, based on a matched standard in a matrix of non-target DNA. *Metrologia* **46**, 08021-08021 (2009).

- [16] Parkes H. et al. *Traceability of complex biomolecules and biomarkers in diagnostics-effecting measurement comparability in clinical medicine* <https://www.euramet.org/research-innovation/search-research-projects/details/project/traceability-of-complex-biomolecules-and-biomarkers-in-diagnostics-effecting-measurement-comparabi/>. T2 J11 CLINBIOTRACE. EURAMET. Accedido: 2022-06-29. 2009.
- [17] M. John, G. O'Connor y H. Parkes. *Final Report. Study of Measurement Service and Comparison Needs for an International Measurement Infrastructure for the Biosciences and Biotechnology: Input for the BIPM Work Programme* <http://www.bipm.org/utis/common/pdf/rapportBIPM/2011/02.pdf>. Rapport BIPM-2011/02 Report Number: LGC/R/2011/123. Accedido: 2022-06-29. 2011.
- [18] Foy C et al. *Final Publishable JRP Report: Metrology for monitoring infectious diseases, antimicrobial resistance and harmful micro-organisms* <https://www.euramet.org/research-innovation/search-research-projects/details/project/metrology-for-monitoring-infectious-diseases-antimicrobial-resistance-and-harmful-micro-organisms/>. HLT08 INFECT-MET, EURAMET. Accedido: 2022-06-29. 2015.
- [19] Parkes H. et al. *Final Publishable JRP Report: Traceability for biologically relevant molecules and entities* <https://www.euramet.org/research-innovation/search-research-projects/details/project/traceability-for-biologically-relevant-molecules-and-entities/>. SIB54 Bio-SITrace EURAMET. Accedido: 2022-06-29. 2017.
- [20] A. S. Whale, G. M. Jones, J. Pavšič, et al. Assessment of Digital PCR as a Primary Reference Measurement Procedure to Support Advances in Precision Medicine. *Clin. Chem.* **64**, 1296-1307 (2018).
- [21] G. Dagher, K-F. Becker, S. Bonin et al. Pre-analytical processes in medical diagnostics: New regulatory requirements and standards. *N. Biotechnol.* **52**, 121-125 (2019).
- [22] C. H. Coxon, C. Longstaff y C. Burns. Applying the science of measurement to biology: Why bother? *PLoS Biol.* **17**, e3000338 (2019).
- [23] P. H. *Bioanalysis: The final frontier of metrology* <https://www.cenam.mx/memorias/download/simposio%202002/doctos/sp002.pdf>. Accedido: 2022-06-29. 2002.
- [24] M. Quaglia, V. Bellotti, S. Cano et al. P2-233 Better measurement for improved diagnosis and management of alzheimer's disease: update on the empir neuromet project. *Alzheimer's & Dementia* **14**, P759-P760 (2018).
- [25] Scherpere A. and French Speaking Society for Chest Medicine (SPLF) Experts Group. Guidelines of the French Speaking Society for Chest Medicine for management of malignant pleural mesothelioma. *Respir. Med.* **101**, 1265-1276 (2007).
- [26] L. Birch, C. L. Archard, H. C. Parkes y D. G. McDowell. Evaluation of LabChip™ technology for GMO analysis in food. *Food Control* **12**, 535-540 (2001).
- [27] C. F. Terry, N. Harris y H. C. Parkes. Detection of Genetically Modified Crops and Their Derivatives: Critical Steps in Sample Preparation and Extraction. *J. AOAC Int.* **85**, 768-774 (2002).
- [28] D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar y B. Meibohm. *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications* 4.^a ed. ISBN: 978-1-4614-6486-0 (Ed. Springer, New York, 2013).
- [29] P. G. Nugent, J. Cornett, I. W. Stewart y H. C. Parkes. Personal monitoring of exposure to genetically modified microorganisms in bioaerosols: Rapid and sensitive detection using PCR. *J. Aerosol Sci.* **28**, 525-538 (1997).
- [30] P. Tavella, M. J. T. Milton, M. Inguscio y N. D. Leo. *Metrology: from physics fundamentals to quality of life* 2.^a ed. (Amsterdam y Bologna, 2017).