

CIENCIAS DE LA VIDA - #7

REVISTA

**DE LAS JORNADAS DE
JÓVENES INVESTIGADORES**

**LA EDUCACIÓN Y LA CIENCIA
TRANSFORMAN REALIDADES**



**Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO**



**UNIVERSIDAD
NACIONAL ✦
DE TUCUMÁN**

Revista de las Jornadas de Jóvenes Investigadores
Eje Ciencias de la Vida, Volúmen 7.

© 2025, Asociación de Universidades del Grupo Montevideo.

ISSN 3121-2190

Tucumán, Argentina. Noviembre de 2025.



**Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO**



**UNIVERSIDAD
NACIONAL ♦
DE TUCUMÁN**

Contenido

Análisis del perfil proteico de aislados de <i>Macrophomina phaseolina</i> con distintos grados de virulencia.....	5
<i>Andrea Ortiz</i>	
Caracterización nutricional del polen apícola del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina) y su digestibilidad aparente en <i>Apis mellifera L</i>	20
<i>Matías Ledesma</i>	
Asociación entre sobrepeso, obesidad y el tiempo de uso de pantalla en población adolescente de la Escuela Secundaria Ramón Araujo en Junio 2025.....	40
<i>Mijail Kotowicz</i>	
La administración de progesterona regula la expresión de factores relacionados con la neuroinflamación en un modelo murino de endometriosis inducida.....	61
<i>Carla Sabrina Rojas</i>	
5'-tiARN-Gly como biomarcador seminal en reproducción asistida: análisis comparativo de cuantificación por ddPCR y RT-qPCR.....	78
<i>Sabrina Velásquez</i>	
Apalutamida modula la viabilidad y la migración a través de los genes diana del AR y NOTCH.....	98
<i>Sofía Belén Herrera</i>	
Estimulação osteogênica por scaffolds de quitosana-cálcio associados à sinvastatina: estudo in vitro e in vivo.....	113
<i>Ruan Barra</i>	
Salud bucal y su relación con parámetros lipídicos en pacientes que acudieron a la cátedra de clínica integrada (2016 - 2025).....	133
<i>Ángel Villalba</i>	
Cambio climático y sus nuevos desafíos para el control vectorial de <i>Triatoma infestans</i> silvestre en zonas residenciales de Chile central.....	147
<i>Catalina Aguilar</i>	
Avaliação do letramento em saúde e sua relação com variáveis sociodemográficas em pessoas idosas da comunidade.....	169
<i>Ana Lima</i>	
Evaluación del contenido de lípidos peroxidados en plántulas de soja (<i>Glycine max</i>) inducidas por la exposición de semillas a radiación	181
<i>Carolina Ramel</i>	

Algoritmos de aprendizaje automática para mejorar la eficiencia en la predicción genómica en maíz y trigo.....	188
<i>Sebastián Filipigh</i>	
Mutación y toxicidad de células vegetales en división celular por efecto del látex de ochoó (<i>Hura crepitans</i>).....	207
<i>Guelvid Divico</i>	
Cambios productivos en la Comuna de Alpachiri y El Molino a partir de la creación del Parque Nacional Campo de los Alisos-Aconquija (1995-2025).....	219
<i>Sergio Osoreo</i>	
Modelado de contaminantes atmosféricos urbanos asociados al tránsito vehicular en el complejo Alem de la Universidad Nacional del Sur.....	239
<i>Facundo Carrizo</i>	
Caracterización de detergentes biodegradables a base de coenzimas obtenidas de la fermentación de residuos agroindustriales.....	259
<i>Ivía Montaña</i>	
Dinámica de <i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga O157:H7 en modelos acuáticos.....	279
<i>Lola Calabró</i>	
Frecuencia de anemia en embarazadas que acuden a dos hospitales públicos. Alto Paraná, 2024.....	289
<i>Daisy Rivas</i>	
Efecto de la aplicación de tres microorganismos benéficos en el cultivo de Melón (<i>Cucumis melo</i> L.).....	298
<i>Diana Barreto</i>	
Evaluación del uso de metformina sobre la unidad fetoplacentaria en un modelo murino de hipercolesterolemia materna.....	308
<i>Camila Morello</i>	
Determinación del pH y potencial erosivo de bebidas energizantes en la Ciudad de Concepción-Paraguay.....	324
<i>Julio Cesar Cabral</i>	
Desarrollo de materiales nanocompuestos para la producción eficiente de amoníaco verde.....	330
<i>Nagelin Fuentes</i>	

42.-Microbiología molecular

Análisis del perfil proteico de aislados de *Macrophomina phaseolina* con distintos grados de virulencia

Autor: Ortiz, Andrea; beluotz@gmail.com

Co-autores: lehisa Ouchi, Julio César; jcmiehisa@qui.una.py

Orientadora: Romero Rodríguez, María Cristina; mcrr.84@gmail.com

Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas

Resumen

El estudio del secretoma ha avanzado de forma significativa, lo que ha permitido la comprensión de la comunicación molecular entre un patógeno y el huésped, a través del análisis de proteínas y metabolitos secretados. *Macrophomina phaseolina*, es un fitopatógeno polífago, capaz de afectar a varias especies de plantas. Es un hongo necrotrófico, causante de la muerte de células vegetales para obtener nutrientes, sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre la infección no está completamente dilucidado, por lo tanto, en este estudio se evaluaron tres aislados del hongo con distintos grados de virulencia, observándose diferencias moderadas en su capacidad infecciosa, siendo FCQ71 el más agresivo. Aunque no se registraron variaciones significativas en la biomasa fúngica ante la suplementación con extracto de raíz, sí se evidenciaron diferencias en el rendimiento y perfil de proteínas secretadas, lo que sugiere una respuesta dependiente del aislamiento y de las condiciones del entorno. Estos resultados indican la existencia de una secreción diferencial de proteínas, posiblemente vinculada a mecanismos de adaptación y patogenicidad. Es sabido que secreta diferentes moléculas que sugieren su participación en la patogénesis, sin embargo, se necesitan más análisis para comprobar el rol de estas proteínas, e identificar aquellos que aún no han sido descubiertos, y de ésta manera aportar al conocimiento del mecanismo de infección utilizada por el hongo.

Palabras clave: secretoma, necrotrófico, proteínas

Introducción

Los hongos fitopatógenos son causantes de numerosas pérdidas relacionadas con cultivos de importancia económica a nivel mundial, ya que, además de otros patógenos, constituyen el grupo mayoritario capaces de producir enfermedades en plantas (Agrios, G.N, 1988) Por lo tanto, son los microorganismos más estudiados para conocer los mecanismos moleculares del desarrollo de enfermedades, además este conocimiento permitiría intervenir en el desarrollo de la misma. Actualmente existen varias estrategias que abordan el estudio molecular de las infecciones producido por fitopatógenos, con diferentes enfoques tales como, genómica (Bhadauria et al., 2009), transcriptómica (Tan et al., 2009), proteómica (Quirino et al., 2010) y metabolómica (Allwood et al., 2008). De estas técnicas ómicas, la proteómica aporta información a través del estudio de las proteínas implicadas en la interacción planta-patógeno. Este último enfoque ha sido relevante en el análisis de hongos necrotróficos, que son aquellos que destruyen las células del hospedero para extraer nutrientes y facilitar la colonización (Villajos, s. f.). Los estudios del secretoma de hongos fitopatógenos necrotróficos, como *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, y *Macrophomina phaseolina*, responsables de importantes pérdidas

económicas por su capacidad para infectar múltiples tipos de plantas (Jiménez-Díaz R; 2010) evadiendo la respuesta inmune de la planta (González-Fernández et al., 2010), revela componentes mayoritarios en las que se encuentran las enzimas degradadoras de la pared celular, como las CAZymes. Estos factores contribuyen significativamente a la patogenicidad, promoviendo la destrucción de la planta (Espino et al., 2010; Shah, Atwood, et al., 2009; Shah, Gutierrez-Sanchez, et al., 2009). El estudio de las proteínas secretadas ha revelado que existen dos vías principales de secreción: la convencional, guiada mediante péptido señal, y la no convencional, que podría involucrar vesículas secretorias (Rabouille, 2017; X. Wang et al., 2017). Estas vesículas no solo están encargadas de transportar proteínas, sino también de otros componentes moleculares (De Vallée et al., 2023).

Estudios comparativos entre especies de hongos como *Sclerotinia sclerotiorum* y *B. cinerea* han identificado similitudes en su repertorio de proteínas secretadas, particularmente en las CAZymes (enzimas activas en carbohidratos) (Heard et al., 2015), que son clave para la degradación de la pared celular. Estos hallazgos resaltan la importancia de entender las similitudes genómicas entre patógenos necrotróficos para mejorar las estrategias de control y

manejo de enfermedades. Entre ellas también se destaca *M. phaseolina* (Tassi) Goid. Es un hongo fitopatógeno necrotrófico que ha ganado relevancia por su capacidad de afectar una amplia variedad de cultivos, entre ellos la soja (*Glycine max*) (Dhingra & Sinclair, 1978).

M. phaseolina es capaz de sobrevivir en condiciones adversas mediante estructuras resistentes llamadas microesclerocios, que le permiten persistir en el suelo durante largos periodos y ser fuente de inóculo para la próxima siembra. El ciclo de infección de *M. phaseolina* comienza con la penetración en las raíces de las plantas a través de hifas. Una vez dentro, el hongo secreta enzimas que degradan la pared celular, colonizando el tejido vegetal y provocando lesión hasta causar la muerte de la planta. La capacidad de *M. phaseolina* para sobrevivir en el suelo lo convierte en un patógeno altamente adaptable y difícil de controlar (Orrego A, s. f.). El hongo es responsable de la pudrición carbonosa de la soja (PCS), una enfermedad que puede reducir drásticamente el rendimiento en las cosechas de cultivos de importancia económica. Las condiciones climáticas adversas, como la sequía y las altas temperaturas, favorecen el avance de la infección, lo que ha llevado a la implementación de estrategias de control basadas en prácticas culturales (Gupta et al., 2012), el uso de fungicidas (Mengistu

et al., 2013) y biocontroladores (Vasebi Y, et al. 2013). Sin embargo, una de las soluciones más prometedoras para controlar esta enfermedad es la resistencia genética de la planta, un enfoque que requiere una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que rigen la interacción planta-patógeno (Majumder et al., 2018).

El análisis genómico de *M. phaseolina* ha revelado una alta variabilidad genética y patogénica (Sarr et al., 2014), lo que le permite adaptarse a diversas condiciones ambientales y ampliar su rango de hospedadores. A pesar de los avances en la secuenciación del genoma de este hongo, aún existe una escasez de información sobre los factores específicos de patogenicidad y virulencia que utiliza durante la infección.

Los estudios proteómicos de *M. phaseolina*, en los que se analizan los cambios en la acumulación de proteínas en momentos específicos, han sido clave para identificar enzimas hidrolíticas (Zaman et al., 2020), enzimas antioxidantes secretadas para neutralizar ROS generadas por la planta durante la respuesta de defensa. (Sinha et al., 2021) y proteínas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal (Pineda-Fretez et al., 2023). Se ha reportado que, en estudios comparativos en presencia de tejido vegetal como

estímulo, puede afectar el perfil de proteínas secretadas (Cobos et al., 2010; Pineda-Fretez et al., 2023). Sin embargo, la investigación sobre el perfil proteico de *M. phaseolina* aún está en sus etapas iniciales, lo que refiere la necesidad de un mayor enfoque en esta área.

Uno de los retos más importantes en el estudio de este hongo es identificar los factores de patogenicidad y virulencia que permiten al hongo invadir y destruir al vegetal. Estos factores incluyen enzimas implicadas en la adhesión y penetración del tejido, así como la biosíntesis de toxinas que dañan la planta o interfieren con su sistema inmunológico (Martínez-Villarreal et al., 2016).

Aunque se han logrado avances importantes en la identificación de proteínas clave, la comparación de perfil de proteínas de *M. phaseolina* con distintos grados de virulencia podría brindar mayor información de moléculas asociadas a la virulencia y la comprensión de la interacción planta-patógeno, especialmente en el caso de este hongo. La investigación futura en esta área promete ofrecer soluciones innovadoras para el control de enfermedades y la mejora de cultivos agrícolas.

Objetivos

General:

Analizar el perfil proteico de aislados de

Macrophomina phaseolina con distintos grados de virulencia.

Específicos:

- Determinar la biomasa fúngica asociada a cada aislado durante la infección.
- Evaluar el perfil proteico de los aislados para identificar patrones asociados a la virulencia.

Materiales y Métodos

1. Material vegetal y microbiológico

Fueron empleados aislados de *M. phaseolina* con distintos grados de virulencia codificados como FCQ11, FCQ 71 (proveniente de Campo 9, Departamento de Caaguazú) y FCQ 72 (proveniente de Naranjal, Departamento de Alto Paraná) mantenidos en el cepario micológico del Dpto. de Química Biológica en medio papa agar dextrosa (PDA). En aislado FCQ11 fue identificado mediante la secuenciación de una región del gen Factor de elongación Alpha (TEF), y los aislados FCQ 71 y FCQ72 fueron identificados mediante secuenciación de una región de ITS. Las secuencias fueron depositadas en GenBank con los siguientes códigos ON866534, OM802448 y OM802449, para FCQ11, FCQ71 y FCQ72, respectivamente. Con el fin de mantener la virulencia del hongo, éste es re-aislado del tallo de soja y cultivados en oscuridad durante 4-5 días en medio PDA para utilizarlo como inóculo.

Las plantas de soja para el ensayo de virulencia fueron obtenidas de semillas de soja de la variedad A5009 RG (Nidera, Argentina). Las semillas fueron sembradas en vasos de plástico de 500 mL conteniendo sustrato para planta KEKKILÄ-Professional y cultivadas en una sala a 22-24°C, en condiciones de días largos (16 h luz/8 h oscuridad).

Las semillas de soja R19 utilizadas como suplemento, se desinfectó la superficie con una solución de hipoclorito de sodio activo al 1,5 % durante 3 minutos, una desinfección con etanol al 70 % durante 3 minutos, seguida de múltiples enjuagues con agua estéril para eliminar cualquier residuo.

Las semillas fueron colocadas en papel de filtro humedecido y estéril dentro de placas de Petri e incubarlas en oscuridad y en condiciones asépticas hasta la germinación, durante 5 días. Antes de la inoculación del medio de cultivo se realizó la desinfección de la superficie de las plántulas de soja con una solución de hipoclorito de sodio activo al 1 % durante 1 minuto. Luego, enjuague bien varias veces con agua estéril para eliminar cualquier residuo de hipoclorito de sodio. Finalmente, los cotiledones fueron eliminados y se inoculó el medio con las raíces de plántulas de soja.

2. Ensayo de virulencia en soja A5009 RG (Nidera, Argentina):

Manteniendo el mismo esquema de crecimiento de soja mencionado anteriormente se realizó la infección con aislados de *M.phaseolina* FCQ 11, FCQ 71 y FCQ 72 a quince plántulas por aislado por el método “*Cut stem*” (Twizeyimana et al., 2012) por un periodo de 14 días post-inoculación (dpi), se midieron la longitud de la lesión provocada por el hongo y las características de infección observadas a los 7 y 14 días post inoculación (dpi), con el fin de evaluar el grado de virulencia de los aislados a ser utilizados.

3. Condiciones de crecimiento de *M. phaseolina*

Los aislados de *M. phaseolina* mantenidos en PDA con distintos grados de virulencia serán crecidos en un primer paso en 100mL medio Potato Dextrose Broth (PDB) erlenmeyer de 250 mL según especificaciones del fabricante, añadiendo un taco de medio PDA (de unos 5 mm de diámetro) colonizados por el hongo a cada frasco de cultivo con PDB. Manteniendo los frascos inoculados incubando en oscuridad a 30 °C hasta que el micelio cubra toda la superficie del medio. El tapón de medio PDA colonizado por el hongo será igual en todos los frascos inoculados, hasta 3 días después. Los controles de esterilidad consistieron en medio de cultivo sin inocular con *M. phaseolina*. El micelio de *M. phaseolina* se cultiva en PDB para producir biomasa antes de inocular las

plántulas de soja en MM.

El segundo paso consiste en retirar el medio de cultivo PDB del matraz erlenmeyer de 250mL donde se cultivó *M. phaseolina* lavando el micelio con agua estéril para eliminar cualquier residuo de medio PDB, para luego agregar 50mL de medio mínimo (MM) (20 g.L^{-1} de glucosa; 870 mg.L^{-1} de K_2HPO_4 ; 680 mg.L^{-1} de KH_2PO_4 ; $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 200 mg.L^{-1} de KCl, 200 mg.L^{-1} de CaCl_2 , 200 mg.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mg.L^{-1} de FeSO_4 ; 2 mg.L^{-1} de MnSO_4 ; 2 mg.L^{-1} ZnSO_4 , pH 6 descrito por Suárez *et al.* (Suárez *et al.*, 2005) , y cada frasco suplementado con cuatro plántulas de soja. Además, se crecieron los tres aislados sin plántulas de soja con micelio de *M. phaseolina*. Los controles de esterilidad consistieron en medio de cultivo MM sin inocular con *M. phaseolina* y medios de cultivo sin inóculo y con plántula de soja. Los frascos inoculados y los controles de esterilidad se mantuvieron en oscuridad en estufa microbiológica a 30°C durante 8 días. Se obtuvieron entre cuatro y cinco réplicas biológicas para cada condición, posteriormente se realizó la filtración al vacío para separar el medio de cultivo del micelio.

4. Estimación de la biomasa fúngica de *M. phaseolina*

El micelio separado por filtración fue liofilizado para eliminar el agua y se registró

el peso seco de manera a expresar la biomasa en miligramo de micelio seco por mililitro de medio de cultivo (Papalia *et al.*, 2019). El medio de cultivo filtrado, se mantuvo a -20°C para posterior liofilización y extracción de proteínas.

5. Extracción, cuantificación y separación de proteínas:

La extracción de proteínas se realizó a partir del filtrado liofilizado siguiendo el protocolo precipitación con ácido tricloroacético (TCA)-Acetona y posterior partición con fenol (W. Wang *et al.*, 2006). Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas por el método Bradford (Bradford, 1976). Se realizó la separación de proteínas en función a su peso molecular en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) mediante el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), para posteriormente teñir los geles con azul de Coomassie G-250 (Neuhoff *et al.*, 1988). Los geles fueron escaneados con un densitómetro para analizar la imagen de los geles.

Resultados y Discusión

En este trabajo se realizó un análisis de perfil proteico de tres aislados de *M. phaseolina* con distinto grado de virulente frente a un estímulo vegetal. Se realizó un ensayo previo de virulencia con el objetivo de evidenciar las diferencias en la

capacidad patogénica entre los aislados, posiblemente relacionadas con su perfil de secreción de factores de virulencia.

1. Ensayo de virulencia de aislados de *Macrophomina phaseolina* en la variedad de soja R19

Es importante destacar que los aislados FCQ71 y FCQ72 presentan diferentes grados de virulencia en soja, en condiciones de campo. En las condiciones controladas en cuarto de cultivo se observaron diferencias entre los aislados y todos mostraron capacidad de inducir necrosis en el tallo (**Fig. 1**), sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas.

Se evaluó la virulencia de tres aislados de *Macrophomina phaseolina* (FCQ11, FCQ72 y FCQ71) mediante la medición de la longitud de la lesión en el tallo de plantas de soja a los 7 y 14 días post inoculación (dpi). A los 7 dpi, todos los aislados provocaron lesiones visibles, con valores que oscilaron entre 6 y 8 cm. A los 14 dpi, se observó un incremento en la longitud de la lesión en todas las condiciones, alcanzando valores promedio superiores a 9 cm en el caso del aislado FCQ71.

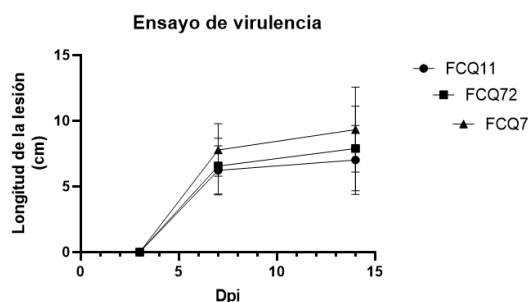


Figura 1. Evaluación de la virulencia de aislados de *Macrophomina phaseolina* en soja por el método “Cut stem”: Longitud de la lesión (cm) medida en tallos de plantas de soja a los 7 y 14 días post inoculación (dpi) con tres aislados del hongo: FCQ11, FCQ72 y FCQ71. Cada punto representa el promedio $\pm$ desviación estándar de 15 réplicas biológicas por condición. El aislado FCQ71 mostró mayor capacidad de inducción de lesión en ambos tiempos evaluados.

El aislado FCQ71 presentó la mayor virulencia, evidenciada por las lesiones más extensas en ambos tiempos evaluados, siendo una característica visual la sequedad del tallo y la observación de microesclerocios. Le siguió FCQ72 que mostró mayor afectación del sistema vascular del tallo y también la aparición de microesclerocios. En contraste FCQ11, que mostró un patrón de progresión más moderado, con manchas superficiales en el tallo y la ausencia de microesclerocios (**Fig. 2**).

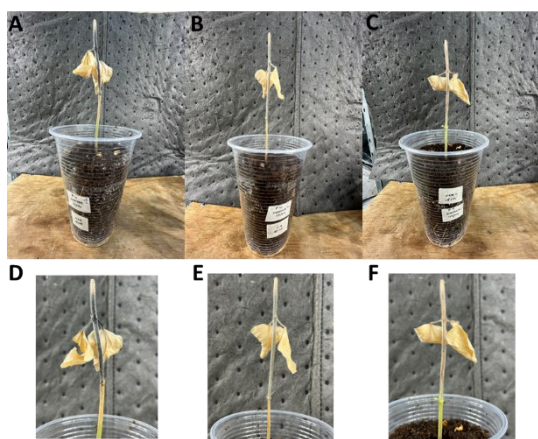


Figura 2 Características de la lesión durante la infección por “Cut stem” por *Macrophomina phaseolina* en plantas de soja. Aspecto externo de plantas inoculadas con distintos aislados del hongo a los 14 días post inoculación. Se observan diferencias en la intensidad de los síntomas como resequead del tallo. En algunos se evidenció formación de microesclerocios (no visibles a simple vista). Las imágenes ilustran la variabilidad fenotípica asociada a la virulencia de los aislados, siendo FCQ 72 (NAR) (Panel A-D), FCQ 71 (C9) (Panel B-E) Y FCQ 11 (Panel C-F)

2. Estimación de la biomasa fúngica de *M. phaseolina*

Se observó el crecimiento de *M. phaseolina* en medios con y sin suplemento de raíz de soja. Los valores de biomasa se mantuvieron en un rango similar para FCQ72 (**Fig 3**). Si bien se observó una ligera tendencia a mayor biomasa en la

condición con suplemento tanto para FCQ71 y FCQ11, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, indicando que la presencia del suplemento radicular no tuvo un efecto marcado sobre el crecimiento fúngico en las condiciones ensayadas. Si bien es de esperarse el aumento de biomasa en medio con suplemento en el crecimiento de *M. phaseolina* en presencia de extractos vegetales, como en trabajos previos desarrollados en el Departamento de Química Biológica, estos resultados podrían deberse a que utilizan medios ricos como PDB durante todo el cultivo, sin embargo en este estudio se realizó primero una ganancia micelial en PDB, seguida de un cultivo en medio mínimo (MM), lo que pudo haber limitado la disponibilidad de nutrientes y enmascarado los efectos del suplemento radicular. Además, es posible que la influencia del extracto radicular no se refleje en el crecimiento total, sino en otros aspectos como la secreción de proteínas o metabolitos, lo que requerirá análisis adicionales para su evaluación.

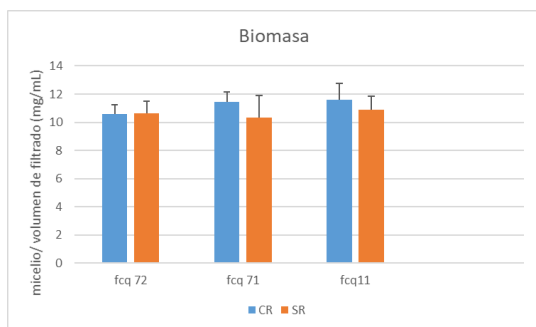


Figura 3. Producción de biomasa de *Macrophomina phaseolina* en medios con (CR) y sin suplemento de raíz (SR) Promedio $\pm$ desviación estándar de la biomasa micelial (mg/mL de filtrado) obtenida para los aislados FCQ72, FCQ71 y FCQ11. No se detectaron diferencias significativas entre las condiciones estudiadas.

3. Extracción, cuantificación y separación de proteínas:

El rendimiento de proteínas secretadas fue variable entre los aislados y dependió de la presencia o ausencia del suplemento de raíz. Para FCQ72 y FCQ71, se observó un mayor rendimiento proteico en la condición sin raíz (SR) (**Fig. 4**), mientras que en FCQ11, el comportamiento fue inverso, con un mayor rendimiento en presencia de raíz (CR). Estos resultados sugieren que la secreción de proteínas por parte de *M. phaseolina* puede estar modulada diferencialmente por señales presentes en el extracto de raíz, y que esta respuesta es específica de cada aislado.

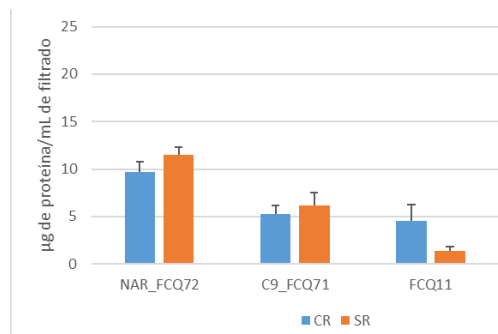


Figura 4. Rendimiento de proteínas secretadas por aislados de *Macrophomina phaseolina* en medios con (CR) y sin raíz (SR), por el método Bradford. Promedio $\pm$ desviación estándar de proteínas totales recuperadas del filtrado para los aislados FCQ72, FCQ71 y FCQ11. Se observó un mayor rendimiento en SR para FCQ72 y FCQ71, mientras que FCQ11 mostró el patrón opuesto.

En la Figura 5 se presentan los perfiles proteicos de las proteínas secretadas por *M. phaseolina* al medio de cultivo con raíz y sin raíz. El perfil de proteínas observada en los controles corresponde a las proteínas de la raíz de soja que fue agregada al medio de cultivo y en el cual no se agregó micelio de hongo. Por tanto, es complejo valor una secreción diferencial en las condiciones suplementadas con raíz. Esta comparación debe realizarse mediante la comparación de proteínas identificadas mediante LC MS/MS, que será realizada como continuación del presente trabajo. Se observaron bandas

prominentes entre 25 y 75 kDa en ambas condiciones, aunque algunas proteínas parecen específicas o más intensas en la condición suplementada con raíz (**Fig.5**)

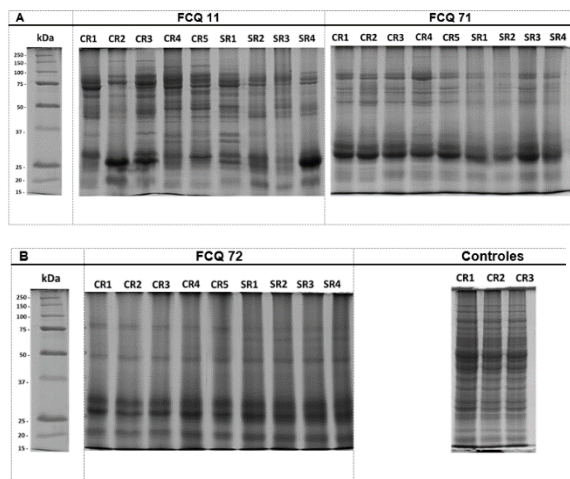


Figura 5. Perfil de proteínas secretadas por los aislados con (CR) y sin (SR) suplemento y Controles con suplemento (CR) de *Macrophomina phaseolina* mediante SDS-PAGE.

Se muestra la separación de proteínas extracelulares obtenidas bajo condiciones con raíz (CR1–CR5) y sin raíz (SR1–SR4). Panel A: FCQ11 y FCQ71, Panel B: FCQ72 y Controles. Se incluye un marcador de peso molecular (izquierda) y controles de medio con suplemento de raíz sin inóculo (CR1–CR3, derecha). Se observan para FCQ72 Y FCQ11 diferencias en la intensidad y el patrón de bandas, con mayor complejidad proteica aparente en CR, para FCQ 71 se mantuvo prácticamente sin cambios aparentes ante la suplementación.

Es importante destacar que existe una diferencia entre los perfiles de proteínas secretadas por los tres aislados, el aislado FCQ11 presenta varias bandas con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa. Esto podría tener implicancias en la capacidad de adaptación y virulencia del hongo frente a diferentes hospederos o condiciones ambientales.

Conclusiones

Los tres aislados de *M. phaseolina* evaluados mostraron mínimas diferencias en su capacidad de infección, destacándose FCQ71 por su mayor agresividad, seguido por FCQ72 y FCQ11 presentando un patrón más moderado. Si bien la biomasa no varió significativamente en presencia del suplemento de raíz, el rendimiento y perfil de proteínas fúngico sí mostraron una respuesta dependiente del aislado y de la condición de cultivo. Existe una secreción diferencial de proteínas secretadas por los distintos aislados.

Como proyección, se plantea la necesidad de identificar las proteínas diferencialmente secretadas mediante análisis proteómico (LC-MS/MS), con el fin de determinar su posible rol en la patogenicidad. Asimismo, será relevante explorar los compuestos presentes en el extracto radicular que podrían estar actuando como señales inductoras, así

como validar funcionalmente las proteínas candidatas para comprender su impacto en la interacción planta-patógeno. Estas aproximaciones permitirán avanzar en la caracterización molecular del secretoma como componente clave en la virulencia de *M. phaseolina*.

Referencias Bibliográficas

Allwood, J. W., Ellis, D. I., & Goodacre, R. (2008). Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. *Physiologia Plantarum*, 132(2), 117-135. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01001.x>

Bhadauria, V., Banniza, S., Wei, Y., & Peng, Y.-L. (2009). Reverse genetics for functional genomics of phytopathogenic fungi and oomycetes. *Comparative and Functional Genomics*, 2009, 380719. <https://doi.org/10.1155/2009/380719>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Cobos, R., Barreiro, C., Mateos, R. M., & Coque, J.-J. R. (2010). Cytoplasmic- and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: A phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Science*, 8(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-46>

De Vallée, A., Dupuy, J.-W., Moriscot, C., Gallet, B., Vanderperre, S., Guignard, G., Rasclé, C., Calvar, G., Malbert, B., Gillet, F.-X., Dieryckx, C., Choquer, M., Girard, V., Poussereau, N., & Bruel, C. (2023). Extracellular Vesicles of the Plant Pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, 9(4), 495. <https://doi.org/10.3390/jof9040495>

Dhingra, O. D., & Sinclair, J. B. (1978). *Biology and Pathology of Macrophomina Phaseolina*. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa.

Espino, J. J., Gutiérrez-Sánchez, G., Brito, N., Shah, P., Orlando, R., & González, C. (2010). The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics*, 10(16), 3020-3034. <https://doi.org/10.1002/pmic.20100037>

- González-Fernández, R., Prats, E., & Jorrín-Novo, J. V. (2010). Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 932527. <https://doi.org/10.1155/2010/932527>
- Gupta, G. K., Sharma, S. K., & Ramteke, R. (2012). Biology, Epidemiology and Management of the Pathogenic Fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with Special Reference to Charcoal Rot of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Journal of Phytopathology*, 160(4), 167-180. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01884.x>
- Heard, S., Brown, N. A., & Hammond-Kosack, K. (2015). An Interspecies Comparative Analysis of the Predicted Secretomes of the Necrotrophic Plant Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLOS ONE*, 10(6), e0130534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130534>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Majumder, S., Datta, K., Sarkar, C., Saha, S. C., & Datta, S. K. (2018). The Development of *Macrophomina phaseolina* (Fungus) Resistant and Glufosinate (Herbicide) Tolerant Transgenic Jute. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00920>
- Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T. S., Moreno-Medina, V. R., Hernández-Delgado, S., & Mayek-Pérez, N. (2016). Bases bioquímicas de la tolerancia al estrés osmótico en hongos fitopatógenos: El caso de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 347-357. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.004>
- Mengistu, A., Reddy, K. N., Bellaloui, N., Walker, E. R., & Kelly, H. M. (2013). Effect of glyphosate on *Macrophomina phaseolina* in vitro and its effect on disease severity of soybean in the field. *Crop Protection*, 54, 23-28.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.07.015>

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 9(6), 255-262. <https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>

Papalia, T., Sidari, R., & Panuccio, M. R. (2019). Impact of Different Storage Methods on Bioactive Compounds in *Arthrospira platensis* Biomass. *Molecules*, 24(15), 2810. <https://doi.org/10.3390/molecules24152810>

(PDF) *Biological control of soybean charcoal root rot disease using bacterial and fungal antagonists In Vitro and greenhouse condition*. (s. f.). Recuperado 24 de junio de 2025, de https://www.researchgate.net/publication/305811443_Biological_control_of_soybean_charcoal_root_rot_disease_using_bacterial_and_fungal_antagonists_In_Vitro_and_greenhouse_condition

(PDF) *ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS CAUSADAS POR HONGOS Y OOMICETOS Naturaleza y control integrado*. (s. f.). Recuperado 11 de septiembre de 2024, de https://www.researchgate.net/publication/364030763_ENFERMEDADES_DE_LAS_PLANTAS_CAUSADAS_POR_HONGOS_Y_OOMICETOS_Naturaleza_y_control_integrado

Pineda-Fretez, A., Orrego, A., Iehisa, J. C. M., Flores-Giubi, M. E., Barúa, J. E., Sánchez-Lucas, R., Jorrín-Novo, J., & Romero-Rodríguez, M. C. (2023). Secretome analysis of the phytopathogen *Macrophomina phaseolina* cultivated in liquid medium supplemented with and without soybean leaf infusion. *Fungal Biology*, 127(5), 1043-1052. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.04.001>

Plant Pathology. (2004). <https://shop.elsevier.com/books/plant-pathology/agrios/978-0-08-047378-9>

Quirino, B. F., Candido, E. S., Campos, P. F., Franco, O. L., & Krüger, R. H. (2010). Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions.

- Phytochemistry*, 71(4), 351-362.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.11.005>
- Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, 27(3), 230-240.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.11.007>
- Sarr, M. P., Ndiaye, M., Groenewald, J., & Crous, P. (2014). Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. *Phytopathologia Mediterranea*, 53, 250-268.
https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-13736
- Shah, P., Atwood, J. A., Orlando, R., El Mubarek, H., Podila, G. K., & Davis, M. R. (2009). Comparative proteomic analysis of *Botrytis cinerea* secretome. *Journal of Proteome Research*, 8(3), 1123-1130.
<https://doi.org/10.1021/pr8003002>
- Shah, P., Gutierrez-Sanchez, G., Orlando, R., & Bergmann, C. (2009). A proteomic study of pectin-degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. *Proteomics*, 9(11), 3126-3135.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200800933>
- Sinha, N., Patra, S. K., Sarkar, T. S., & Ghosh, S. (2021). Secretome analysis identified extracellular superoxide dismutase and catalase of *Macrophomina phaseolina*. *Archives of Microbiology*, 204(1), 62. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02631-w>
- Suárez, M. B., Sanz, L., Chamorro, M. I., Rey, M., González, F. J., Llobell, A., & Monte, E. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 42(11), 924-934.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.08.002>
- Tan, K.-C., Ipcho, S. V. S., Trengove, R. D., Oliver, R. P., & Solomon, P. S. (2009). Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Molecular Plant Pathology*, 10(5), 703-715.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00565.x>

- Twizeyimana, M., Hill, C. B., Pawlowski, M., Paul, C., & Hartman, G. L. (2012). A Cut-Stem Inoculation Technique to Evaluate Soybean for Resistance to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 96(8), 1210-1215. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0126-RE>
- Villajos, S. O. (s. f.). *Hongos Fitopatógenos*.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., & Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27(13), 2782-2786. <https://doi.org/10.1002/elps.200500722>
- Wang, X., Chung, K. P., Lin, W., & Jiang, L. (2017). Protein secretion in plants: Conventional and unconventional pathways and new techniques. *Journal of Experimental Botany*, 69(1), 21-37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx262>
- Zaman, N. R., Kumar, B., Nasrin, Z., Islam, M. R., Maiti, T. K., & Khan, H. (2020). Proteome Analyses Reveal *Macrophomina phaseolina*'s Survival Tools When Challenged by *Burkholderia contaminans* NZ. *ACS Omega*, 5(3), 1352-1362. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01870>

41. Salud Animal

Caracterización nutricional del polen apícola del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina) y su digestibilidad aparente en *Apis mellifera* L.

Autor: Ledesma González, Matías Francisco; matias.ledesma@uns.edu.ar

Co-autor(es): Grandinetti, Gisela; Pérez, Mónica; Reynaldi, Francisco José; Tourn, Elian; Fernández, Leticia Andrea.

Laboratorio de Estudios Apícolas - Departamento de Agronomía Universidad Nacional del Sur

Resumen

El polen es la principal fuente de proteínas, lípidos, y otros nutrientes para la abeja doméstica (*Apis mellifera* L.). La apicultura está fuertemente consolidada en República Argentina, siendo la región del sudoeste bonaerense un sector apícola importante. Los objetivos de este trabajo fueron: caracterizar nutricionalmente los principales tipos polínicos recolectados por *A. mellifera* en dos temporadas apícolas en esta región y estimar su digestibilidad aparente (DA) mediante ensayos *in vitro* con abejas obreras. Para ello, se recolectó polen apícola en cinco sitios de esta zona y posteriormente se separaron en grupos de polen de un mismo origen botánico. Se realizó la cuantificación de proteína cruda (PC) y soluble (PS) lípidos totales (LT), contenido de hidratos de carbono no estructurales (HCNE) y fibra detergente neutro (FDN). Posteriormente, se prepararon dietas con esos pólenes y TiO_2 a modo de sustancia marcadora y se alimentaron abejas obreras recién emergidas para calcular sus valores de DA. Los tipos polínicos analizados presentaron diferencias en su composición nutricional y su DA. El polen apícola presentó valores de DA de $59,70 \pm 13,6 \%$. La DA se relacionó positivamente con el contenido de HCNE y PS, y negativamente con el contenido de FDN. El contenido de LT parece no ser un parámetro de importancia en la conformación de esta variable. Esta caracterización integral del polen y su utilización por *A. mellifera* contribuye a profundizar en el conocimiento de la nutrición en este insecto y será de utilidad en el diseño de estrategias sanitarias y de alimentación para la apicultura en general.

Palabras clave: *Apis mellifera*, polen, digestibilidad aparente

Introducción

Las plantas productoras de polen, especialmente las plantas con flor (Angiospermae), muchas veces requieren la intervención de insectos para llevar a

cabo la polinización (Frankie y Thorp, 2009). Las abejas domésticas realizan esta función al actuar como agentes polinizadores en su búsqueda de recursos alimenticios. Para esta especie, el polen es

la principal fuente de proteínas y lípidos, como así también de vitaminas y minerales (Black, 2006).

El polen apícola, también conocido como polen corbicular, es elaborado por las abejas pecoreadoras a partir de los granos de polen recolectados durante sus visitas a distintas fuentes florales. Para producir el polen apícola, las abejas cepillan los granos de polen adheridos en su cuerpo y los aglutinan con néctar, permitiendo la formación de una masa compacta

denominada carga corbicular. La confección de estas cargas tiene lugar en una estructura especializada ubicada en el tercer par de patas denominada corbícula. Por viaje de pecoreo, cada abeja transporta dos cargas corbiculares en su tercer par de patas (Figura 1). Usualmente, estas cargas corbiculares son monoflorales, es decir que los granos de polen que la constituyen provienen de un mismo origen botánico (Crane, 1999).

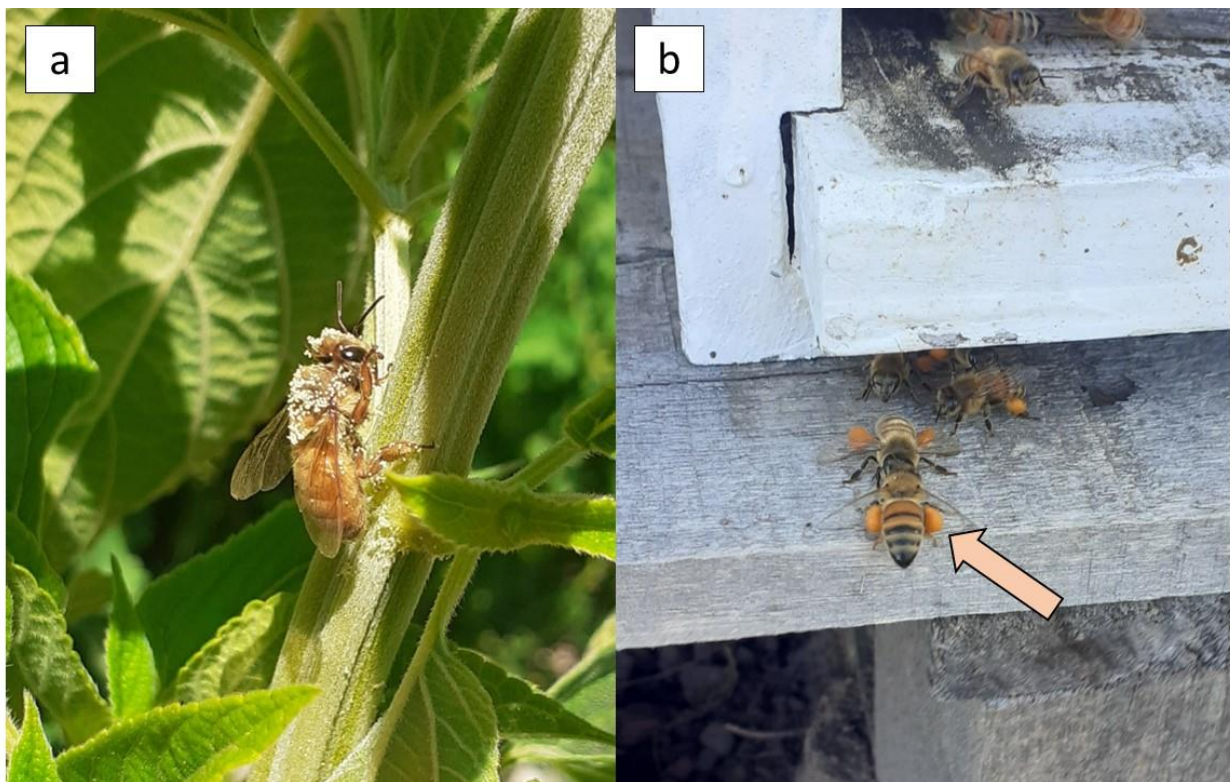


Figura 1. Abejas pecoreadoras **a)** cubierta de polen mientras arma las cargas corbiculares. **b)** retornando a la colonia con las cargas corbiculares en su tercer par de patas (flecha rosa).

Generalmente, cuando se observan los granos de polen al microscopio óptico, se pueden diferenciar tres capas: el pollenkit, la esporodermis y el contenido celular (Figura 2). Cada uno de estos estratos presenta características químicas propias que resultan de interés desde el punto de vista de la nutrición apícola (Black, 2006). El pollenkit es una sustancia viscosa que recubre los granos de polen y constituye aproximadamente entre el 10 y el 15 % del peso de estos (Piffanelli *et al.*, 1998). Su composición es predominantemente lipídica, aunque también incluye carotenoides, flavonoides, proteínas, y carbohidratos. Esta estructura cumple diversas funciones, como atraer a los polinizadores hacia la fuente de polen, proporcionarles sustancias nutritivas y facilitar la confección del polen corbicular (Pacini y Hesse, 2005). Por otro lado, la

esporodermis está compuesta por dos capas denominadas exina e intina. La exina es la capa más externa y se caracteriza por contener esporopolenina, uno de los biopolímeros más resistentes que se conocen en la naturaleza. En cambio, la intina está conformada por polisacáridos como la pectocelulosa y pectinas (Pacini y Franchi, 1999). Estos biopolímeros estructurales que conforman la esporodermis son aparentemente, de poco valor nutricional para *Apis mellifera* al pasar intactos por el tubo digestivo (Black, 2006). Finalmente, el contenido celular del grano de polen constituiría la fracción más nutritiva para las abejas, ya que contiene hidratos de carbono no estructurales, proteínas, lípidos, y otros compuestos (Piffanelli *et al.*, 1998; Pacini y Dolferus, 2004; Black, 2006).

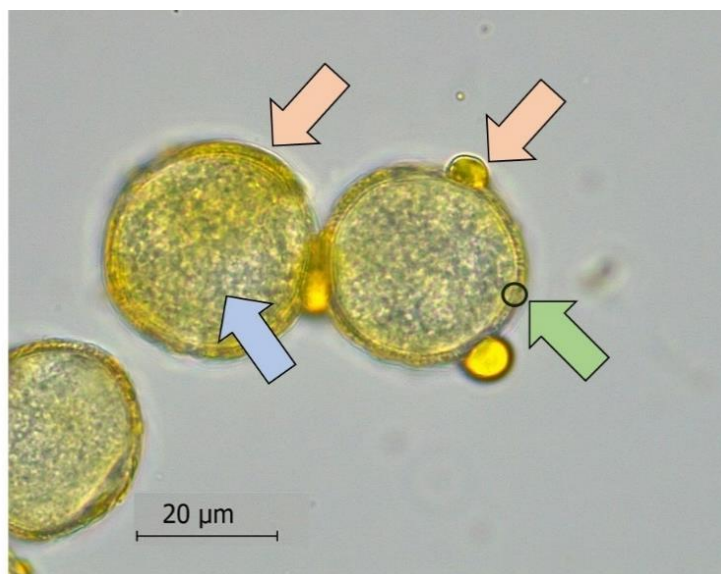


Figura 2. Granos de polen de *Schinus* sp. visto bajo microscopio. Las flechas rosas indican el pollenkit que recubre la superficie del grano de polen. La flecha verde marca una sección de la esporodermis. La flecha celeste indica el contenido celular.

Los coeficientes de digestibilidad son índices que indican el grado de aprovechamiento de un alimento o nutriente ingeridos por una especie animal. Estos índices generalmente tienen valores de 0 a 100 (o 0 a 1), donde 0 indica que las sustancias no son digeridas y, en consecuencia, se encuentran intactas en las heces. En cambio, un valor de 100 (o 1) indica que estas sustancias son totalmente digeridas por el animal y no es posible detectarlas en las deyecciones (McDonald *et al.*, 2007). Una técnica muy utilizada para determinar estos parámetros es la digestibilidad aparente (DA). El fundamento de esta metodología es la comparación de la concentración de una sustancia marcadora (SM) incorporada en los alimentos y su concentración en las heces. Con estos datos, se calcula la DA de las dietas (Zewdie, 2019). Particularmente en *A. mellifera*, evaluamos el dióxido de titanio (TiO_2) como SM en ensayos de DA en condiciones *in vitro*, tanto en polen apícola como en soluciones de azúcares y miel (Ledesma-González *et al.*, 2023^a; Ledesma-González *et al.*, 2025^a). Se concluyó que la concentración óptima de TiO_2 para su empleo en futuros ensayos de DA en ese insecto era de 0,1 % p/p base materia seca (p/p MS) y que las sustancias energéticas eran altamente utilizadas por esta especie al presentar valores de DA superiores al 90 %.

El avance y la intensificación de la agricultura a nivel mundial reducen la disponibilidad de flora nativa y espontánea para las abejas domésticas. Esta situación afecta negativamente la actividad apícola de varias regiones en el mundo (Marini, 2008; Haedo *et al.*, 2017). Las deficiencias nutricionales traen aparejados problemas de salud en la colmena: mayor influencia de parásitos y enfermedades (Brodschneider y Crailsheim, 2010). La República Argentina es uno de los principales productores y exportadores de miel, siendo el sudoeste de la provincia de Buenos Aires un territorio apícola de gran importancia. Esta área comprende 360.000 colmenas y representa cerca del 50 % de la producción nacional de miel (Guardia-López, 2023). Pese a ello, la caracterización nutricional y el nivel de aprovechamiento de las distintas fuentes polínicas por parte de la abeja doméstica en la región han sido poco estudiadas.

Objetivos

Caracterizar nutricionalmente los principales tipos polínicos recolectados por *A. mellifera* en dos temporadas apícolas en la región del sudoeste bonaerense y estimar los valores de DA de esos tipos polínicos utilizando ensayos *in vitro* con abejas.

Materiales y métodos

Recolección y clasificación del polen apícola

Se utilizaron trampas de polen plásticas del tipo intermedias, colocadas en apiarios de cinco localidades del sudoeste bonaerense en dos temporadas apícolas consecutivas: 2021 - 2022 y 2022 - 2023 (Figura 3). En el

caso particular del polen de *Pinus* sp., éste se colectó manualmente (*Pinus* sp.^{CM}) directamente de los conos masculinos maduros antes de su antesis (mediados de septiembre). Tanto el polen apícola como el de *Pinus* sp.^{CM} se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

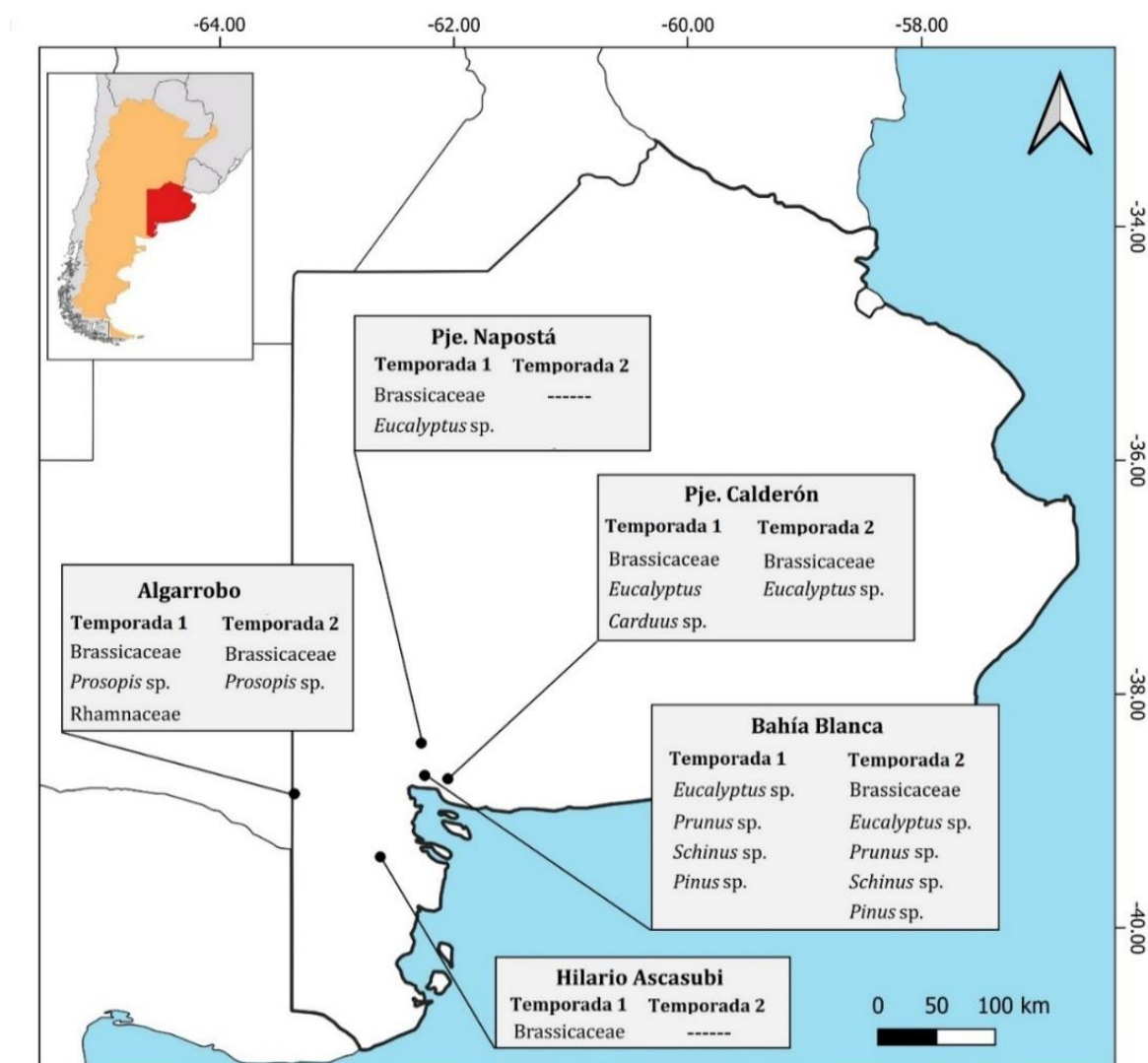


Figura 3. Mapa de la provincia de Buenos Aires indicando los tipos polínicos cosechados por sitio y temporada apícola.

Para la clasificación botánica de las cargas corbiculares obtenidas, inicialmente se realizó una discriminación visual de los tipos predominantes considerando atributos como color, textura y tamaño. Luego se confeccionaron preparados siguiendo la metodología descrita por Wodehouse, (1935) con los tipos de carga más abundantes. Se determinó su origen botánico mediante la comparación con preparados de referencia de la palinoteca del Dpto. de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Este procedimiento permitió asociar las

características visuales de las cargas con su origen botánico, posibilitando la separación de las muestras en grupos exclusivamente compuestos por tipos de polen con un origen botánico en particular (Figura 4). A medida que se obtenían subgrupos, se confirmaba su origen botánico con el microscopio óptico para descartar la presencia de granos de polen de otra procedencia. Los grupos de cargas monoflorales fueron conservados a -20 °C hasta su caracterización nutricional y/o su utilización en los ensayos *in vitro*.

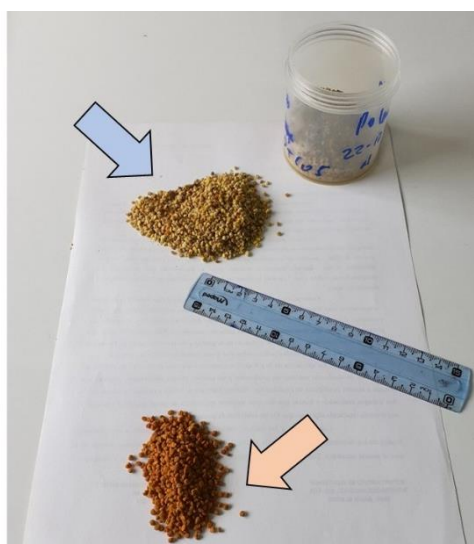


Figura 4. Separación de cargas corbiculares. La flecha azul indica las muestras recolectadas del campo. La flecha rosa indica un grupo cargas corbiculares de un tipo polínico en particular, en este caso *Schinus* sp.

Caracterización nutricional del polen apícola

Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas en las muestras de polen se utilizaron dos

metodologías: proteína cruda (PC) y proteína soluble (PS).

La PC se estimó con el método Kjeldahl, que permite determinar el contenido total de nitrógeno. El valor de nitrógeno fue convertido a porcentaje de PC con un factor de 5,60 (Rabie *et al.*, 1983). Esta

determinación se realizó en el Laboratorio de Servicios Analíticos de Suelos, Plantas y Ambiente (LABSPA-CONICET, Dpto. de Agronomía- UNS).

Con el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) se cuantificó la PS. El pretratamiento de las muestras de polen se realizó siguiendo la metodología de Westreich y Tobin, (2021). Para ello, se colocaron 20 mg de muestra fresca en tubos Eppendorf nuevos con 1,5 mL de una solución acuosa de NaOH 0,1 M. Luego de 24 horas de incubación a temperatura ambiente, los tubos fueron centrifugados durante 30 segundos. A continuación, se tomó una alícuota de 35 μ L del sobrenadante que se transfirió a un nuevo tubo con 1,5 mL de solución Bradford. Se dejó reposar por 15 minutos y se midió la absorbancia de la solución a 595 nm con un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 295. Las curvas estándar para la estimación del contenido de PS se prepararon con suero de albúmina bovina (BSA; DSF Lab). Los resultados se expresaron como miligramos de proteína soluble por miligramo de muestra seca ($\times 10^{-3}$ mg/mg).

Cuantificación de lípidos totales

La cantidad de lípidos totales (LT) se estimó mediante extracción con solvente utilizando un equipo Goldfish (LABCONCO). Para ello se secaron en estufa las muestras de polen y sobres de papel secante (Whatman) por 24 horas a

60 °C. Un gramo de polen seco fue molido con un mortero y se colocó dentro de los sobres previamente pesados. Luego, los sobres con las muestras se colocaron en el Goldfish para la extracción de lípidos. El proceso tuvo una duración de seis horas empleando hexano como solvente a un ritmo constante de goteo de una gota por segundo. Finalizada la extracción, se retiraron los sobres y se secaron en estufa 24 horas a 60 °C. Posteriormente las muestras se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron (Nielsen, 2017).

Cuantificación de hidratos de carbono no estructurales

Para la estimación del contenido total de hidratos de carbono no estructurales (HCNE), las muestras fueron hidrolizadas con el procedimiento propuesto por Carrizo-García *et al.*, (2013) con algunas modificaciones. El objetivo de este tratamiento en las muestras fue convertir carbohidratos complejos, como el almidón, en monosacáridos detectables mediante la técnica de Dubois *et al.*, (1956). Para ello, 100 mg de polen fresco molido se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL con cinco mL de una solución *buffer* de acetato de sodio (50 mM; pH 4,8). Los tubos se mantuvieron en un baño ultrasónico a temperatura ambiente 10 minutos para favorecer la dispersión del material en la solución. Luego, se agitaron con vortex un minuto para desagregar los restos de polen. De inmediato, los tubos se

incubaron en baño María a 100 °C 10 minutos con el fin de detener cualquier actividad biológica residual. Una vez enfriados, se añadieron cinco mL de la misma solución buffer con el agregado de amiloglucosidasa (10 U/mL) y se incubaron dos horas a 16 ± 1 °C para hidrolizar los polisacáridos.

Pasado este período, los tubos fueron centrifugados 15 minutos a 2200 rpm. El sobrenadante se utilizó para cuantificar la cantidad de azúcares reductores presentes en la solución (Dubois *et al.*, 1956) como se mencionó previamente. Para ello, se colocaron 20 µL del sobrenadante en un matraz aforado de 5 mL con 980 µL de AD. A continuación, se agregaron 500 µL de una solución de fenol (5 % p/v) y luego 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Después de 10 minutos de incubación, los matraces fueron colocados en baño maría a 30 °C 15 minutos para el desarrollo de color. La absorbancia de las soluciones fue medida a 492 nm con un espectrofotómetro (Metrolab RC 325). Para estimar la concentración de HCNE, se empleó una curva de calibrado con una solución estándar de glucosa (400 µg/ml). Los resultados se expresaron en gramos de carbohidratos por 100 gramos de muestra seca.

Cuantificación de fibra detergente neutro

El contenido de fibra detergente neuro (FDN) se determinó mediante la metodología de Van Soest, (1963) con

algunas modificaciones. Dado que las bolsas utilizadas tradicionalmente para esta técnica poseen un diámetro de poro de 45 µm, y considerando que el diámetro ecuatorial de los granos de polen de las muestras evaluadas osciló entre los 18 y 55 µm (Forcone, 2014), fue necesario ajustar el procedimiento por pérdidas de material durante la digestión. Para ello, se confeccionaron manualmente bolsas con filtros de nylon con un diámetro de poro de 0,22 µm (diámetro de 45 mm; Rephile Bioscience Ltd.) utilizando una selladora de calor.

Se colocaron 300 mg de polen seco dentro de las bolsas previamente secadas y pesadas y se sellaron térmicamente. Se empleó un digestor Ankom 220 del Laboratorio de Nutrición Animal del Dpto de Agronomía, UNS. Grupos de 27 bolsas se colocaron dentro del equipo con una solución de detergente neutro, la cual fue calentada a 100 °C durante una hora. La solución se preparó disolviendo 18,6 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Anedra), 30 g de sodio lauril sulfato (Anedra), 4,6 g de fosfato disódico (Cicarelli), 6,8 de borato de sodio (Anedra), y 10 ml de trietilenglicol (Sigma Aldrich) en un litro de AD. Finalizada la digestión, las bolsas fueron enjuagadas tres veces con AD a 100 °C 15 minutos dentro del mismo equipo. Posteriormente, las bolsas fueron colocadas en una estufa a 60 °C 48 horas para medir el peso seco. En cada grupo de

digestión se incluyó una bolsa vacía como control. Los resultados se expresaron como gramos de FDN por 100 gramos de muestra seca (%).

Diseño experimental y formulación de las dietas de polen apícola

La recolección y el manejo de las abejas obreras adultas recién emergidas se siguieron de acuerdo con Ledesma-González *et al.*, (2025^a). Un total de 22 dietas se prepararon utilizando el polen monofloral seleccionado (Figura 1). Para ello, las cargas corbiculares frescas fueron suavemente desagregadas y homogeneizadas utilizando un mortero, con la adición de TiO₂ para alcanzar una concentración final de 0,1 % p/p MS de esa sustancia. Las dietas formuladas se almacenaron a -20 °C hasta su uso en los experimentos.

Los ensayos *in vitro* consistieron en la alimentación de abejas obreras recién emergidas con las dietas basadas en polen (Ledesma-González *et al.*, 2025^a). Para ello se llevaron adelante tres ensayos: dos con el polen obtenido de la temporada apícola 2021-22 utilizando abejas de primavera y otro con abejas de fin de temporada (verano) y uno con polen de la temporada 2022-23 en abejas de verano.

Determinación de digestibilidad aparente

La estimación de los valores de DA se obtuvieron utilizando la técnica de Short *et al.*, (1996) adaptada a las abejas domésticas (Ledesma-González *et al.*,

2025), comparando la concentración de TiO₂ en el alimento suministrado y en las heces (Fórmula 1).

$$DA (\%) = 100 \times \left(1 - \frac{[s.m.alimento]}{[s.m.heces]}\right)$$

Fórmula 1. DA (%): Digestibilidad aparente de una dieta. *[s.m.alimento]* y *[s.m.heces]*: concentración de la sustancia marcadora en la dieta y heces, respectivamente.

Análisis estadísticos

Se utilizaron modelos lineales mixtos (LMMs) para el análisis del contenido de proteína soluble y de FDN. En cambio, para el resto de las variables se recurrieron a modelos mixtos generalizados (GLMMs). Las temporadas como los sitios se consideraron factores aleatorios. Se realizaron análisis de PCA y de correlación.

Resultados y discusión

En este estudio se caracterizaron nutricionalmente los principales tipos polínicos recolectados por *Apis mellifera* en cinco localidades de la región del sudoeste bonaerense durante dos temporadas apícolas (2021-22 y 2022-23). Asimismo, se determinó la DA de estos tipos polínicos mediante la utilización de ensayos *in vitro* con abejas obreras recién emergidas.

Se separaron ocho tipos polínicos a partir de las muestras recolectadas en los sitios de muestreo en ambas temporadas apícolas: Brassicaceae, *Carduus* sp., *Eucalyptus* sp., *Pinus* sp.^{CM}, *Prosopis* sp., *Prunus* sp., *Schinus* sp. y Rhamnaceae

(Figura 5). En la Tabla 1 se detallan los resultados de los análisis nutricionales del polen evaluado. Cabe mencionar que la segunda temporada apícola (2022-23) fue particularmente seca, con lo cual, la recolección de polen se vio fuertemente disminuida. Por ese motivo, no se separó suficiente cantidad de polen de *Carduus* sp. y Rhamnaceae, y en el sitio Paraje Napostá no se pudo coleccionar el volumen necesario de muestras para los estudios. Sólo polen de Brassicaceae y de *Eucalyptus* sp. fue recolectado en suficiente cantidad para los análisis y

ensayos *in vitro* en más de un sitio en las dos temporadas. Tampoco se obtuvieron suficientes cargas de *Pinus* sp. en ambos períodos. Sin embargo, se decidió utilizar este tipo polínico porque es considerado por los apicultores como una fuente polínica de muy mala calidad para las colonias de abejas. Generalmente, este polen no es colectado de manera abundante cuando está disponible a principios de primavera, excepto cuando hay una fuerte escasez de otras fuentes alimenticias de mejor calidad.

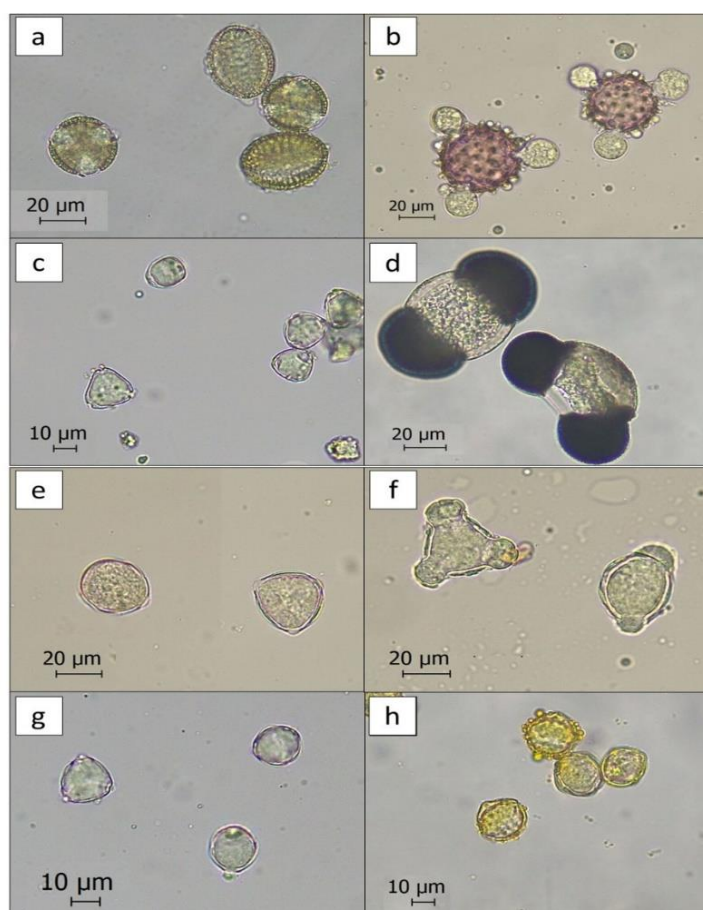


Figura 5. Granos de polen de ocho tipos polínicos recolectados en la región del sudoeste bonaerense, vistos bajo microscopio óptico. **a)** Brassicaceae **b)** *Carduus* sp. **c)** *Eucalyptus* sp. **d)** *Pinus* sp. **e)** *Prosopis* sp. **f)** *Prunus* sp. **g)** Rhamnaceae **h)** *Schinus* sp.

Tabla 1. Composición nutricional de los distintos tipos polínicos evaluados en dos temporadas apícolas (2021-22 y 2022-23) en cinco sitios de la región del sudoeste bonaerense.

Tipo polínico	Temporada *	Localidad **	Proteína cruda (%)	Proteína soluble (x10 ⁻³ mg/mg)	Lípidos totales (%)	H. de carbono no estructurales (%)	Fibra detergente neutro (%)
Brassicaceae	1	2	22.1	47,7 ± 11,5 ^{a-b}	9,51 ± 0,5 ^{a-b}	34,8 ± 1,39 ^a	31,6 ± 5,7 ^a
	1	3	21.3	20,3 ± 15,2 ^a	11,13 ± 1,5 ^{a-b}	35,0 ± 3,30 ^a	29,8 ± 6,6 ^a
	1	4	22.4	57,8 ± 25,7 ^b	10,06 ± 1,3 ^{a-b}	36,7 ± 1,89 ^a	38,9 ± 2,3 ^a
	1	5	22.7	49,8 ± 25,0 ^{a-b}	11,71 ± 1,4 ^b	-	31,7 ± 3,4 ^a
	2	1	22.4	82,1 ± 17,2 ^{a-b}	9,45 ± 0,5 ^a	33,0 ± 3,94 ^a	41,7 ± 4,1 ^a
	2	2	21.2	71,2 ± 16,1 ^{a-b}	10,13 ± 0,8 ^{a-b}	30,8 ± 1,28 ^a	32,8 ± 4,6 ^a
	2	4	22.4	90,3 ± 9,6 ^b	9,26 ± 0,5 ^{a-b}	32,1 ± 2,45 ^a	36,2 ± 5,3 ^a
	Promedio ± DS		22.1 ± 0.6	69,7 ± 25,0^B	10,19 ± 1,2^D	33,7 ± 3,0^{B-C-D}	34,4 ± 5,7^A
Eucalyptus sp.	1	1	24.8	100,2 ± 13,4 ^a	1,61 ± 1,2 ^a	34,9 ± 2,98 ^a	38,8 ± 2,2 ^a
	1	2	25.7	111,8 ± 48,9 ^a	1,51 ± 0,7 ^a	34,3 ± 2,02 ^a	52,4 ± 2,3 ^b
	1	3	24.9	76,3 ± 4,2 ^a	3,37 ± 2,5 ^a	-	28,3 ± 9,3
	2	1	24.9	106,4 ± 29,2 ^a	1,52 ± 0,3 ^a	37,5 ± 3,40 ^a	35,4 ± 5,6 ^a
	2	2	25.2	130,6 ± 19,1 ^a	1,69 ± 0,4 ^a	40,0 ± 4,02 ^a	39,0 ± 1,7 ^b
	Promedio ± DS		25.1 ± 0.4	111,0 ± 29,4^C	1,98 ± 1,4^A	36,7 ± 3,6^{C-D-E}	39,6 ± 9,0^A
Pinus sp. ^{CM}	1	1	10.5	8,0 ± 1,9	1,40 ± 0,5	15,4 ± 1,71	78,7 ± 4,1
	2	1	14.3	2,7 ± 1,2	2,16 ± 0,55	11,1 ± 1,51	61,6 ± 2,2
	Promedio ± DS		-	4,0 ± 2,7^A	1,82 ± 0,6^A	13,3 ± 2,7^A	71,9 ± 9,9^B
Schinus sp.	1	1	22.3	67,1 ± 6,3	2,72 ± 0,5	28,7 ± 2,00	26,9 ± 0,3
	2	1	18.9	132,0 ± 18,7	2,81 ± 0,8	31,0 ± 3,56	29,0 ± 3,2
	Promedio ± DS		-	115,7 ± 33,5^C	2,76 ± 0,6^{A-B}	29,9 ± 2,9^B	27,9 ± 2,2^A
Prunus sp.	1	1	22.6	70,1 ± 3,6	2,56 ± 0,8	37,5 ± 2,33	30,7 ± 6,7
	2	1	25.3	136,8 ± 22,3	3,56 ± 0,3	35,0 ± 3,62	39,1 ± 4,1
	Promedio ± DS		-	120,1 ± 35,7^C	3,12 ± 0,8^{A-B}	36,2 ± 3,0^{C-D-E}	27,9 ± 2,2^A
Prosopis sp.	1	4	24.0	56,4 ± 8,2	4,06 ± 1,5	36,7 ± 6,92	30,7 ± 1,9
	2	4	20.3	72,4 ± 11,4	2,92 ± 1,1	38,7 ± 1,26	42,1 ± 1,2
	Promedio ± DS		-	68,4 ± 12,6^B	3,64 ± 1,4^B	37,7 ± 4,6^{D-E}	36,4 ± 6,4^A
Carduus sp.	1	2	14.4	104,2 ± 19,2	6,66 ± 1,4	40,4 ± 2,85	26,0 ± 3,9
	Promedio ± DS		-	104,2 ± 19,2^C	6,66 ± 1,4^C	40,4 ± 2,8^E	26,0 ± 3,9^A
Rhamnaceae	1	4	26.7	120,5 ± 35,5	2,72 ± 0,7	30,4 ± 2,30	39,4 ± 5,9
	Promedio ± DS		-	120,5 ± 35,5^C	2,72 ± 0,7^{A-B}	30,4 ± 2,3^{B-C}	39,4 ± 5,9^A

Nota: (*) Temporada apícola: (1) 2021-2022, (2) 2022-2023. (**) Localidades: (1) Bahía Blanca, (2) Paraje Calderón, (3) Paraje Napostá, (4) Estación Algarrobo, (5) Hilario Ascasubi. (***) Pollen colectado a mano. Letras en los superíndices muestran resultados análisis *post hoc* (Tukey test; p value < 0.05).

Respecto al contenido de PS, los valores de las muestras fluctuaron entre $0,0015 \times 10^{-3}$ y $176,70 \times 10^{-3}$ mg/mg en base materia seca, con un promedio de $84,08 \times 10^{-3} \pm 42,8 \times 10^{-3}$ mg/mg, resultados similares a otros autores que también utilizaron el método Bradford para su estimación. Por ejemplo, aún con diferencias en las fuentes botánicas, Gençay-Celemei *et al.*, (2017) determinaron valores de proteína entre $0,32 \times 10^{-3}$ y $176,00 \times 10^{-3}$ mg/mg en distintos tipos de polen apícola de una región particular de Turquía. En cuanto al contenido de PC, todas las muestras evaluadas se consideraron de calidad normal (*average quality*) para el desarrollo de las colonias (Kleinschmidt y Kondos, 1976), excepto el polen de *Pinus* sp.^{CM} (10,5 y 14,3 %) y de *Carduus* sp. (14,4 %), que presentaron valores de PC inferiores al 20 %. En particular, el polen de *Pinus* sp.^{CM} mostró los valores más bajos de PC y PS con respecto a los otros pólenes apícolas estudiados. Roulston y Cane (2000) afirmaron que las gimnospermas anemófilas tienen valores bajos de proteína, ya que no necesitan ofrecer recompensas a los insectos polinizadores. Por otro lado, el polen de *Carduus* sp. mostró valores bajos de PC y altos de PS. Los valores de PC encontrados en este tipo polínico fueron coincidentes con otros autores (Andrada *et al.*, 2004; Radev, 2022). Por otro lado, Russo *et al.*, (2019)

estudiaron el contenido de PS en el polen de diversas especies nativas de Pennsylvania (EEUU) y en *Carduus acanthoides* y su relación con el número de visitas de polinizadores. Entre varios otros factores, atribuyeron el elevado número de visitas en *C. acanthoides* al contenido de PS alto del polen. En este sentido, el caso de *Carduus* sp. pone de manifiesto la utilidad de considerar la cuantificación de PS como un complemento a la PC tradicionalmente utilizada en la clasificación de la calidad nutricional del polen para *A. mellifera*.

El contenido de LT varió entre 0,55 % a 13,65 %. El polen de Brassicaceae presentó valores significativamente superiores con respecto al resto de las muestras. Además, este polen presentó diferencias significativas entre los sitios de colecta. Por el contrario, *Pinus* sp.^{CM} y *Eucalyptus* sp. exhibieron los valores más bajos de lípidos totales (Tabla 1). Estos resultados coinciden con trabajos previos realizados en el oeste de la provincia de La Pampa en algunas de estas especies (Brassicaceae, *Carduus* sp., *Eucalyptus* sp. y *Prosopis* sp.) (Teysserie, 2018). Estas observaciones nos indicarían que la oferta cuantitativa de este nutriente sería estable a lo largo de los sitios y años, y que la provisión de lípidos estaría más relacionada al tipo de oferta floral.

Los carbohidratos constituyen aproximadamente dos tercios del peso

seco del polen apícola (Villanueva *et al.*, 2002; Kieliszek *et al.*, 2017). Las muestras evaluadas tuvieron en promedio valores similares (70,65 %), en cambio, el polen de *Pinus* sp.^{CM} presentó valores superiores de carbohidratos totales (83,51 %). En este sentido, el contenido de HCNE mostró un rango amplio comprendido entre 9,67 % (*Pinus* sp.^{CM}) a 43,95 % (*Prosopis* sp.). Este parámetro se mantuvo relativamente constante en todos los tipos de polen apícola evaluados ($34,86 \pm 4,2$ %). Aunque se ha reportado una gran variabilidad para este parámetro en muestras de polen de todo el mundo, como sugiere una revisión de Thakur y Nanda (2020) (18,50 a 82,80 %), nuestros valores coincidieron con otros trabajos (Villanueva *et al.*, 2002; Bertoncelj *et al.*, 2018). La fuente principal de HCNE parecería ser el néctar o la miel que las pecoreadoras agregan a los granos de polen para aglutinarlos cuando confeccionan las cargas corbiculares (Thakur y Nanda, 2020). Esto explicaría los valores bajos en el polen de *Pinus* sp.^{CM} respecto al resto del polen apícola. Estos nutrientes son eficazmente utilizados por las abejas melíferas (Gmeinbauer y Crailsheim, 1993; Ledesma-González *et al.*, 2025^a), debido a que cuentan con una variedad de enzimas necesarias para la hidrólisis de diversos tipos de sacáridos (Zoltowska *et al.*, 2012; Ricigliano *et al.*, 2017). Otros hidratos de carbono, junto a la esporopolenina, cumplen principalmente

una función estructural al conformar las paredes del grano de polen (Pacini y Franchi, 1999). Estos compuestos se caracterizan por ser altamente resistentes a la degradación enzimática (Klungness y Peng, 1984), constituyendo, hasta donde se conoce, una fracción poco aprovechable nutricionalmente para las abejas melíferas. El contenido de FDN varió entre 36,78 % (Brassicaceae) y 83,41 % (*Pinus* sp.^{CM}). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de polen apícola analizados, aunque la mayoría mostró valores cercanos a los $35,20 \pm 7,3$ %. Esto sugiere que esta variable es relativamente constante en este tipo de matriz. Los resultados de este trabajo fueron significativamente superiores a los de otros autores (Negrao *et al.*, 2014; Alshallash *et al.*, 2022). Sin embargo, los mencionados autores emplearon la técnica de fibra cruda en lugar de FDN. No se ha podido establecer una comparación con otros valores de FDN en polen apícola debido a que, hasta el momento, no se han encontrado trabajos en la bibliografía que hayan utilizado esta técnica. El proceso de estimación de la fibra cruda remueve casi toda la hemicelulosa y gran parte de la lignina y celulosa, cuantificando la fracción más indigerible del material vegetal. En cambio, el procedimiento de FDN estima casi el total del contenido de la pared celular (Segura *et al.*, 2002; FOSS, 2018).

La Figura 6 muestra un análisis de componentes principales (CPA) que relaciona distintas variables nutricionales con los tipos polínicos estudiados. El primer componente explicó el 45,0 % de la varianza, y el segundo el 28,5 %, acumulando un 73,5 % de la variación total. *Pinus* sp.^{CM} aparece agrupado en el extremo negativo del PC1 y alto en PC2,

asociado a altos valores de FDN y bajos de PC, PS y DA. En cambio, las muestras de *Carduus* sp. y *Prunus* sp. mostraron una fuerte asociación a los vectores HCNE y DA. *Eucalyptus* sp. y *Schinus* sp., aunque con mayor dispersión, se asocian a las variables de PS y DA. Brassicaceae se asocia a altos valores en el contenido de LT.

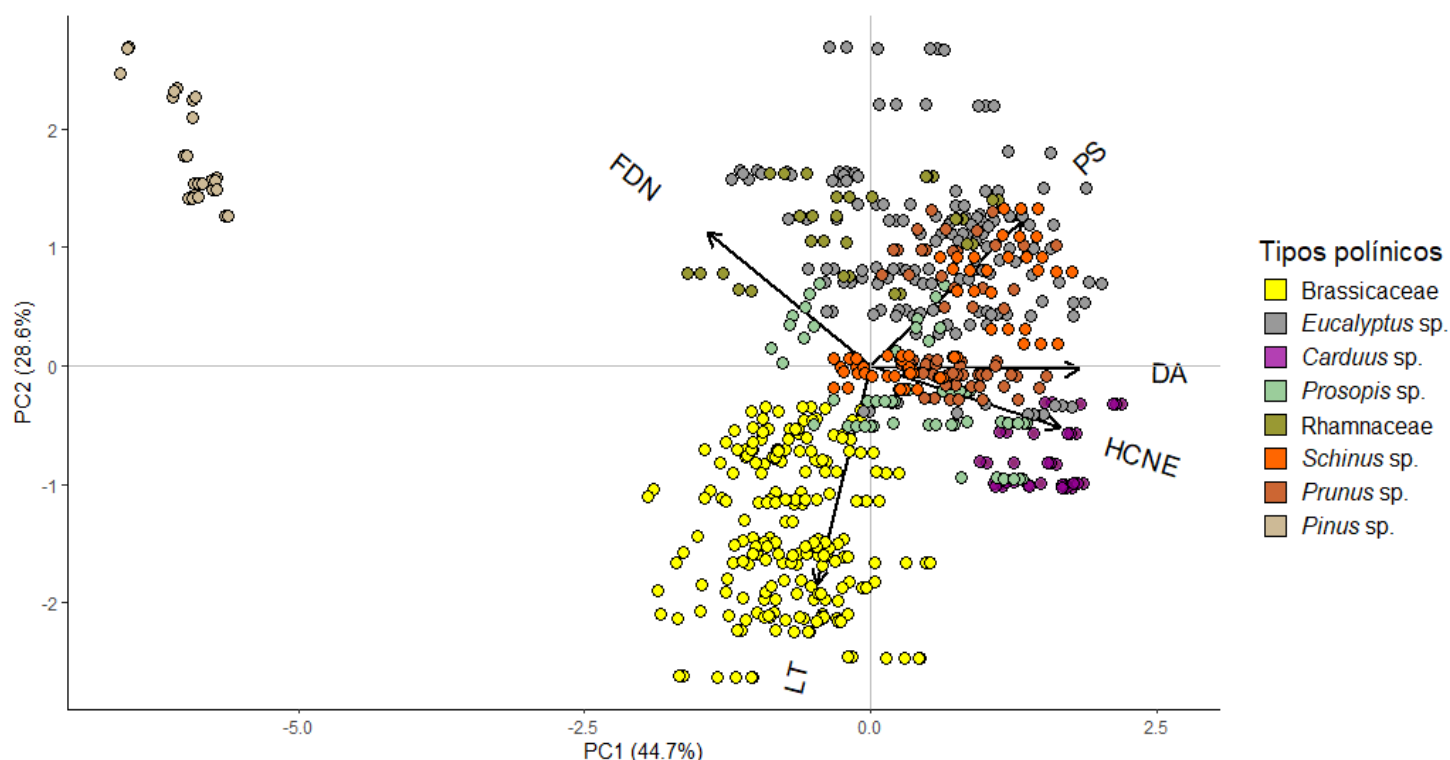


Figura 6. Análisis de componentes principales donde se relaciona la composición nutricional y la digestibilidad aparente de los ocho tipos polínicos recolectados durante dos temporadas apícolas en la región del sudoeste bonaerense.

Los valores de DA de las dietas formuladas con polen apícola variaron en un rango de 0 a 82,28 % con un promedio de $59,70 \pm 13,6$ %. Las dietas de *Schinus* sp. presentaron los valores más altos de DA ($70,75 \pm 7,3$ %), seguidas por *Carduus* sp. ($68,59 \pm 8,4$ %), *Prunus* sp. ($66,00 \pm 7,7$ %), *Prosopis* sp. ($62,26 \pm 13,7$ %), *Eucalyptus* sp. ($62,13 \pm 10,4$ %), Rhamnaceae ($54,84 \pm 19,9$ %), Brassicaceae ($50,23 \pm 12,9$ %) y *Pinus* sp.^{CM} ($0,40 \pm 0,5$ %). Con respecto a los sitios de colecta, se observaron diferencias estadísticas en los valores de DA de las dietas de Brassicaceae, en cambio, no sucedió lo mismo en las dietas de *Eucalyptus* sp.

La DA está fuertemente relacionada con el contenido de HCNE, y en menor medida con el contenido de PS, de acuerdo con el análisis de PCA (Figura 6). En cambio, el vector FDN se ubica casi en oposición al de DA. Como se discutió anteriormente, los HCNE son altamente aprovechables por este insecto a diferencia de los constituyentes de las paredes del grano de polen. Estas dos fracciones serían las más influyentes en los valores de DA en el polen apícola. En vista de la relación entre el vector DA y PS, la PS sería una porción muy utilizable por *A. mellifera* como se ha demostrado en trabajos previos (Wang *et al.*, 2015; Omar *et al.*, 2022; Ledesma-González *et al.*, 2025^b). Por otro lado, el contenido de LT parecería no influir en los valores de DA de las dietas polínicas al

ubicarse en una posición ortogonal a la misma. Existe poca bibliografía en la cual se evalúe la digestibilidad de los lípidos en esta especie, pero Ledesma-González *et al.*, 2023^b encontraron que la digestibilidad de los lípidos y de ácidos grasos es baja, excepto para los ácidos grasos linolénico y palmítico. Estos resultados podrían deberse a excreciones endógenas encontradas en el contenido rectal que enmascara el grado de utilización de estos compuestos por parte de *A. mellifera* (datos sin publicar).

No se encontró efecto de las temporadas sobre las variables evaluadas en el polen. Estas observaciones indicarían, tal como se discutió previamente respecto al contenido lipídico, que las fuentes polínicas serían nutricionalmente estables en el tiempo. En cuanto a las localidades, solo dos tipos polínicos pudieron ser evaluados en más de una localidad: Brassicaceae y *Eucalyptus* sp. Con respecto a este último género botánico, no se detectaron diferencias entre las distintas localidades, lo que indica que esta fuente de polen es poco variable nutricionalmente dentro de esta región. Brassicaceae, en cambio, presentó diferencias significativas entre localidades en todas las variables, excepto en el contenido de HCNE. La heterogeneidad observada en estas muestras podría explicarse por el hecho de que este polen pertenece a una familia estenopolínica (Khalil, 2002; INTA, 2019).

Esto significa que estas muestras están conformadas por cargas corbiculares constituidas por distintos granos de polen a nivel de especie y género dentro de la familia, y no pueden ser discriminados entre los sitios de muestreo utilizando el microscopio. A diferencia de *Eucalyptus* sp., que se encuentra representado principalmente por una o dos especies (Borzone *et al.*, 2007; Bedotti *et al.*, 2017), Brassicaceae cuenta con una mayor diversidad en la región (Andrada *et al.*, 1998; Valle *et al.*, 2001).

Conclusiones

Los tipos polínicos analizados presentaron diferencias en su contenido nutricional y su DA. Por el contrario, no se observaron variaciones estadísticas entre las dos temporadas para las variables evaluadas. Estos resultados indicarían que estas fuentes polínicas serían nutricionalmente estables en la región estudiada a lo largo del tiempo.

La mayoría del polen apícola evaluado presentó valores de PC suficientes para no ser considerados de mala calidad nutricional para *A. mellifera*, y valores promedio de $88,12 \times 10^{-3}$ mg/mg de PS. El contenido de carbohidratos, tanto estructurales como no estructurales, fue similar en todos los tipos de polen apícola estudiados y constituyeron cerca del 70 % del contenido de las muestras. El polen apícola presentó valores de DA de $59,70 \pm 13,6$ %. La DA del polen apícola está

positivamente relacionada con el contenido de HCNE y PS, y de manera negativa con el contenido de FDN. El contenido de LT parece no ser una variable de importancia en la conformación de esta variable. Esta caracterización integral del polen y su utilización por *A. mellifera* contribuye a profundizar en el conocimiento de la nutrición en este insecto y será de utilidad en el diseño de estrategias sanitarias y de alimentación para la apicultura en general.

Referencias bibliográficas

- Alshallash K. S., Abolaban G., Elhamamsy S. M., Zaghloul A., *et al.*, (2023). Bee pollen as a functional product—chemical constituents and nutritional properties. *J. of Ec. Eng.* 24(2), 173-183.
- Andrada A., Valle A., Aramayo E., Lamberto S., & Cantamutto M. (1998). Análisis polínico de las mieles de las sierras australes de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Invest Agr: Prod Prot Veg*, 13, 265-275.
- Andrada A., Valle A., Paoloni P., Gallez L. (2004) Pollen and nectar sources used by honeybees pollinating sunflower (*Helianthus annuus*) in the Colorado River Valley, Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 39: 75 – 82. ISSN 0373-580 X
- Bertoncelj J., Polak T., Pucihar T., Lilek N., Kandolf-Borovšak A., *et al.*, (2018). Carbohydrate composition of Slovenian bee pollens. *Int. J. of Food Sc. & Tech.*, 53(8), 1880-1888.

Black J. (2006). Honeybee Nutrition: Review of research and practices. *Australian Government. Rural In. Res. & Dev. Co.*, pub. N° 06/052. ISBN 1 74151 315 4

Borzone H. A., Bardi J. F., & Laddaga J. E. (2007). Crecimiento de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh cultivado como cortina en un establecimiento agropecuario del Partido de Azul (Pcia. de Bs. As.). *Quebracho (Santiago del Estero)*, (14), 65-73.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *An. Bioch* 72: 248-254

Brodschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294. doi10.1051/apido/2010012

Carrizo-García C., Guarnieri M. & Pacini E. (2013). Iter-Conversion of Carbohydrate Reserves from Pollen Maturation to rehydration in a Chili Pepper. *Am. J. of Plant Sc.* 4, 1181 – 1186.

Crane E. (1990). Bees and beekeeping. Science, practice and world resources. *Comstock Pub. Associates*, ISBN 0801424291.

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. & Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *An. Chem.* 28(3), 350-356.

Forcone A. (2014). Atlas melisopalinológico de la Patagonia Austral. - 1a ed. - Bahía Blanca : Editorial de la UNS. Ediusn. ISBN 978-987-1907-79-3

FOSS. (2018). *Fibre analysis of animal feed: Crude fibre, neutral detergent fibre and acid detergent fibre – the standards and the automation options* (eBook). FOSS Analytics.

Frankie G.W. & Thorp R. W. (2009). Pollination and pollinators. In V. H. Resh & R. T. Cardé (Eds.), *Enc. of Ins.* (2nd ed., 813–818). Academic Press.

Gençay-Çelemlı O., Barkan N. P., Özenirler C., Özel-Demiralp D., Sorkun K. (2017) Protein analysis of Anzer bee pollen by Bradford method. *Mellifera* 17(1): 21-32

Gmeinbauer R., & Crailsheim K. (1993). Glucose utilization during flight of honeybee (*Apis mellifera*) workers, drones and queens. *J. of Ins. Phy.*, 39(11), 959-967.

Guardia-López A. R. (2023) Sumando valor y desarrollo a la cadena apícola. *Revista MDA*, La Plata, Argentina. 4(3), 7-10. Online ISSN 2718- 6660

Haedo J., Stalldecker P., Marrero H. J. (2017) Plantas nativas del sudoeste bonaerense potencialmente útiles para la conservación de los polinizadores en agroecosistemas. *BioScriba* 8(1): 12-23

INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (PROAPI). 2019. *Guía para la caracterización de mieles argentinas.*

Ministerio de Agricultura, Ganadería y pesca. Presidencia de la Nación.

Khalik K. N. E. A. (2002). Biosystematic studies on Brassicaceae (Cruciferae) in Egypt. PhD tesis, ISBN 90-5808-685-2.

Khanizadeh S., Buszard D., & Zarkadas C. G. (1995). Misuse of the Kjeldahl method for estimating protein content in plant tissue. *HortScience*, 30(7), 1341-1342.

Kleinschmidt G. J. & Kondos A. C. (1977) The influence of crude protein levels on colony production. *South African Bee J.* 49(4): 16-19

Klungness L. M. & Peng Y. S. (1984). A histochemical study of pollen digestion in the alimentary canal of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. of Ins. Phys.*, 30(7), 511-521.

Kieliszek M., Piwowarek K., Kot A. M., Błażej S., Chlebowska-Śmigiel A., et al., (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Sc. & Tech.* 71, 170-180.

Ledesma-González^a M. F., Tourn E., Fernández L. A., Reynaldi J. F. (2023) Digestibilidad en *Apis mellifera* L.: utilización del dióxido de titanio (TiO₂) como sustancia marcadora. *Revista Veterinaria* 34(2): 69-75

Ledesma-González^b M. F., Grandinetti G., Tourn E., Fernández L. A. & Reynaldi F. J. (2023). Apparent digestibility of lipids and fatty acids by *Apis mellifera* (L.): a comparative study of different bee pollen types collected in Argentina. 48°

International Apicultural Congress: Apimondia. 4 al 8 de septiembre 2023, Santiago, Chile.

Ledesma-González^a M. F., Grandinetti G., Tourn E., Fernández L. A., Reynaldi J. F. (2025) Effects of sugar and honey solution on honey bee (*Apis mellifera* L.) nutrition and physiology. *J. of Api. Res.*: 10.1080/00218839.2025.2484888

Ledesma-González^b M. F., Medici S. K., Grandinetti G., Schulz G. I., Tourn E., Reynaldi F. J. & Fernández L. A. (2025). Evaluation of protein and amino acid composition of pollen and its use by domestic honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, en revisión.

Mæhre H. K., Dalheim L., Edvinsen G. K., Elvevoll E. O., Jensen I. (2018) Protein determination – Method matters. *Foods* 7(1): 5.
<https://doi.org/10.3390/foods7010005>

Marini M. F. (2008) El avance de la frontera agrícola en el área adyacente al sistema Sierras de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). *Investigaciones Geográficas* 47: 111-121. ISSN: 0213-4691

McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D., Morgan C. A., Sinclair L. A., et al., (2011). *Animal nutrition* (7th ed.). Pearson.

Negrao A. F., Barreto L. M., & Orsi R. O. (2014). Influence of the collection season on production, size, and chemical composition of bee pollen produced by *Apis mellifera* L. *J. of Ap. Sc.*, 58(2), 5.

Nielsen S. S. (2017). *Food analysis* (5th ed.). Springer.

Omar E., Darwish H. Y. A., Othman A. A. (2022) Crushing corn pollen grains increased diet digestibility and hemolymph protein content while decreasing honey bee consumption. *Apidologie* 53:52. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00963-0>

Pacini E. & Dolfeus R. (2002). The Trials and Tribulations of the Plant Male Gametophyte — Understanding Reproductive Stage Stress Tolerance. *Flora*.

Pacini E. & Franchi G. G. (1999). Pollen grain sporoder and types of dispersal units. *Acta Soc. Bot. Poloniae* 68(4), 299 – 205.

Pacini E. & Hesse M. (2005). Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora* 200, 399–415.

Piffanelli P., Ross J. H. E. & Murphy, D. J. (1998). Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex Plant Reprod* 11, 65–8

Rabie A. L., Wells J. D., Dent L. K. (1983) The nitrogen content of pollen protein. *J. of Ap. Res.* 22(2), 119-123

Ricigliano V. A., Fitz W., Copeland D. C., Mott B. M., Maes P., et al., (2017). The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. *Arch. of Ins. Biochem. and Phys.* 96(2), e21406.

Roulston T. H., Cane J. H. (2000) Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst. and Ev.* 222, 187-209

Russo L., Vaudo A. D., Fisher C. J., Grozinger C. M., Shea K. (2019) Bee community preference for an invasive thistle associated with higher pollen protein content. *Oecologia*, <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04462-5>

Short F.J., Gorton P., Wiseman J., Boorman K. N. (1996) Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal Feed Sc. & Tech.* 59(2): 15-221.

[https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00916-7](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00916-7)

Soest P. V. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. of the Ass. of Official Agr. Chem.* 46(5), 829-835.

Teyssaire C. (2018). Caracterización de los recursos polínicos estivales colectados por *Apis mellifera* L. en el oeste de la región pampeana. Tesis de grado.

Thakur M. & Nanda V. (2020) Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Sc. and Tech.* 98, 82–106

Valle A., Andrada A., Aramayo E., Gallez L., & Lamberto S. (2001). Mieles de la región periserrana del Sistema de Ventania, Argentina. *Invest Agr: Prod Prot Veg*, 10, 343-352.

Villanueva M. O., Marquina A. D., Serrano R. B., & Abellán G. B. (2002). The importance of bee-collected pollen in the diet: a study of its composition. *Int. J. of Food Sc. and Nutr.* 53(3), 217-224.

Wang Y., Ma L., Hang X., Yang W., Liu F., et al., (2015) Digestion of protein of two pollen types in China by the honeybee (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 45(5): 590-600. 10.1007/s13592-014-0278-1

Wodehouse R. P. (1935) Pollen grains: their structure, identification and significance in science and medicine. McGraw-Hill Book Co., NewYork, NY.

Westreich L. R. & Tobin P. T. (2021) Comparison of pollen grain treatments without mechanical fracturation prior to protein quantification. *J. of Insect Sc.* 21(4), 1–4.

Zewdie A. K. (2019). The Different Methods of Measuring Feed Digestibility: A Review. *EC Nutrition* 14(1): 68-74.

Żółtowska K., Lipiński Z., Łopieńska-Biernat E., Farjan M. & Dmitryjuk M. (2012). The activity of carbohydrate-degrading enzymes in the development of brood and newly emerged workers and drones of the Carniolan honeybee, *Apis mellifera carnica*. *J. of Ins. Sc.*, 12(1), 22.

Agradecimientos

Apreciamos la colaboración del bioquímico Diego M. Iaconis y de la Dra. Soledad García Paoloni por la provisión de muestras de polen.

Financiamiento

Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Ltda. y Cámara Apicultores Pampero (en conjunto CAP) financió los insumos para todas las caracterizaciones de polen apícola descriptas previamente.

CONICET otorgó a Matías F. Ledesma González una beca doctoral (2022-2027)

39. Salud Humana

**Asociación entre sobrepeso, obesidad y el tiempo de uso de
pantalla en población adolescente de la Escuela Secundaria
Ramón Araujo en Junio 2025 y otros factores relacionados con la
salud.**

Autor: Kotowicz, Mijail

Contacto: mijailkotowicz@fm.unt.edu.ar

Co-autores: Caballero Pacheco, Juan I.; Morales, María P.; Garcia Cardenas,
Tomas.

Orientadora: Valdez Abadia, Miryam D.

Contacto: danielavaldezabadia@gmail.com

Universidad Nacional de Tucumán
Facultad de Medicina.
Junio de 2025.

RESUMEN

Este estudio tuvo como **objetivo principal** relacionar el estado nutricional, específicamente el sobrepeso y la obesidad, con el tiempo de uso de pantallas de teléfono en adolescentes de la Escuela Secundaria Ramón Araujo en junio de 2025. Los objetivos específicos incluyeron determinar la prevalencia de sobrepeso y obesidad, y evaluar la prevalencia del uso de pantallas en teléfono en esta población. La **metodología** empleada fue un estudio cuantitativo, observacional, descriptivo y de corte transversal. La población de estudio consistió en alumnos de 3° a 6° año de secundaria. Las variables clave analizadas fueron el tiempo de uso de pantallas (clasificado en menos de 2 horas, 2 a 4 horas y más de 4 horas diarias) y el estado nutricional, evaluado mediante el Índice de Masa Corporal (IMC) y categorizado como bajo peso, eutrófico, sobrepeso u obesidad según los percentiles de la Sociedad Argentina de Pediatría (SAP). Los datos se recolectaron a través de un cuestionario autoadministrado y una ficha de datos antropométricos, y fueron procesados en Microsoft Excel. Entre los

resultados principales, se encontró que el 41.33% de los 104 alumnos encuestados presentaba exceso de peso (24.03% sobrepeso y 17.30% obesidad). En cuanto al uso de pantallas, el 43,3% de los adolescentes reportó un uso excesivo, superando las 4 horas diarias. Se observó una clara relación directa: a mayor tiempo de exposición a pantallas, mayor es la prevalencia de sobrepeso y obesidad. Específicamente, el 50% de los alumnos con obesidad utilizaba pantallas más de 4 horas al día, mientras que los estudiantes con peso adecuado (eutróficos) tendían a un uso menor, concentrándose en menos de 2 a 3 horas diarias.

Palabras claves: uso del teléfono celular, estado nutricional, adolescentes.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad caracterizada por “una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal que puede ser perjudicial para la salud”. Es crónica, de causa multifactorial y, en la mayoría de los casos, se presenta con exceso de peso (Organización Mundial de la Salud [OMS], 1997). Se diferencia del sobrepeso en que, aunque ambos implican un aumento del peso corporal, en

la obesidad ese aumento se debe a una acumulación mucho mayor de grasa corporal, lo que conlleva un mayor riesgo para la salud. Esta diferencia se establece generalmente a través del índice de masa corporal (IMC).

A diferencia de la obesidad en adultos, la obesidad infantil presenta características particulares debido a su impacto durante etapas clave del desarrollo físico, emocional y social. Sus consecuencias tienden a manifestarse de manera temprana y a perpetuarse en la vida adulta si no se interviene a tiempo. Es un problema de salud pública con repercusiones físicas, metabólicas, psicológicas y sociales (Ministerio de la Nación, 2021). Se asocia con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, incluida la hipertensión arterial (Asociación Americana del Corazón, 2019); alteraciones metabólicas como dislipidemia, enfermedad hepática grasa no alcohólica, resistencia a la insulina; y con diabetes tipo 2, cuya evolución en jóvenes implica mayor morbilidad y mortalidad que cuando se diagnostica en adultos (Marcus & Cols, 2022, p.877); también se ha identificado un aumento del riesgo de daño renal, tanto por mecanismos directos (como inflamación crónica y disfunción endotelial) como indirectos (mediados por hipertensión y diabetes), favoreciendo el desarrollo de

enfermedad renal crónica (Carullo & Cols, 2023); además, se asocia con apnea del sueño (Lobstein & Cols, 2004); trastornos ortopédicos (Sánchez & López, 2015) y un incremento en la prevalencia de enfermedades autoinmunes; puede también agravar el pronóstico en enfermedades graves como el cáncer infantil (Sassine & Cols, 2025); en el plano emocional y social, se relaciona con baja autoestima, ansiedad, depresión y dificultades en la integración, afectando significativamente la calidad de vida (Sánchez & Cols, 2022).

El sobrepeso y la obesidad infantil poseen causas multifactoriales, entre ellos, la inactividad física y el sedentarismo, especialmente el uso excesivo de pantallas, juegan un papel central en su desarrollo. El tiempo prolongado frente a televisores, computadoras, tablets o celulares no solo reduce las oportunidades de actividad física, sino que también se asocia con una mayor exposición a publicidad de alimentos no saludables, alteraciones del sueño y hábitos alimentarios inadecuados (Perez & Cols, 2022). Otros factores que también contribuyen a la obesidad infantil incluyen la predisposición genética, el entorno intrauterino desfavorable, la alimentación poco saludable y la ausencia de políticas públicas que garanticen entornos alimentarios y recreativos

saludables (Sociedad Argentina de Pediatría, 2021) (Woo Baidal & Cols, 2016).

Durante la pandemia de covid-19 se evidenció que el tiempo de exposición a pantallas en población adolescente creció de forma sustancial, alcanzando en muchos casos más de seis horas diarias (Cáritas Española, 2022). Este incremento estuvo vinculado no solo a la virtualización de las clases, sino también a la ausencia de alternativas de ocio, al aislamiento social y a las dificultades estructurales para acceder a espacios físicos adecuados. Este uso excesivo trajo aparejadas múltiples consecuencias en la salud y el desarrollo de los adolescentes. En el plano físico, se observó un aumento del sedentarismo, alteraciones del sueño y cambios negativos en la alimentación, con potencial impacto en el estado nutricional y el peso corporal (Fung & Cols, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda evitar completamente el uso de pantallas en niños menores de 2 años y limitarlo a un máximo de una hora diaria en niños de 2 a 5 años, siempre con supervisión y contenido apropiado. En niños mayores y adolescentes, se sugiere que el uso de pantallas no interfiera con el sueño, la actividad física, las relaciones sociales ni el desempeño escolar (OMS, 2019).

La evidencia actual muestra una asociación clara y consistente entre el uso de pantallas (televisión, videojuegos, computadoras, teléfonos inteligentes y otros dispositivos electrónicos) y el sobrepeso en niños, adolescentes y adultos jóvenes. Diversos estudios observacionales y metaanálisis han demostrado que a mayor tiempo frente a pantallas, mayor es el índice de masa corporal (IMC) y la probabilidad de desarrollar sobrepeso u obesidad, observándose un aumento del 42 % en el riesgo cuando se superan las 2 horas diarias de exposición (Asociación Americana del Corazón, 2018).

A nivel mundial, en 2022, más de 390 millones de niños y adolescentes de entre 5 y 19 años presentaban sobrepeso. La prevalencia del sobrepeso (incluida la obesidad) en este grupo etario ha aumentado de forma alarmante: pasó del 8 % en 1990 al 20 % en 2022, afectando de manera similar a ambos sexos. Ese año, el 19 % de las niñas y el 21 % de los niños tenían sobrepeso (OMS, 2025).

En América Latina y el Caribe, se estima que 49 millones de niños, niñas y adolescentes viven con sobrepeso, lo que representa un 30,6 % de la población infantil y juvenil de la región, una cifra superior a la media mundial. La mayoría de los países y territorios presentan tasas

elevadas de sobrepeso (incluida la obesidad) (UNICEF, 2023).

En este contexto, Argentina se destaca como el país de América Latina y el Caribe con mayor prevalencia de sobrepeso infantil (incluida la obesidad), afectando al 36,5 % de los niños de entre 5 y 19 años. Además, ocupa el segundo lugar en prevalencia de obesidad infantil, con un 16,9 % de niños exclusivamente obesos, sólo por detrás de las Bahamas (17,2%) (UNICEF, 2023).

En Tucumán, según el servicio de nutrición del Hospital de Niños, las cifras de niños y adolescentes hasta los 19 años con sobrepeso u obesidad alcanzan al 51%. Antes de 2020, esta patología alcanzaba entre 30 % y 40 % de los menores (Hospital del Niños Jesús, 2025). La evidencia actual muestra que tanto la duración como el horario y la regularidad del sueño están estrechamente relacionados con el riesgo de sobrepeso, obesidad y otros trastornos metabólicos en niños, adolescentes y adultos (Etchegaray & Cols, 2023) (Kumar & Kelly, 2017). Dormir menos horas de las recomendadas se asocia de manera consistente con un mayor riesgo de obesidad y adiposidad, tanto en estudios transversales como longitudinales, en diferentes grupos etarios y poblaciones (Anderson & Cols, 2024) (Engberg & Cols, 2019). Sin embargo, no solo la cantidad

de sueño es relevante: la hora a la que se inicia el sueño (es decir, acostarse tarde) y la variabilidad en los horarios de sueño también se han identificado como factores de riesgo independientes para el aumento de peso y la disfunción metabólica (Li & Cols, 2020).

En niños y adolescentes, acostarse más tarde y la irregularidad en los horarios de sueño se asocian con mayor adiposidad, mayor ingesta calórica nocturna, menor actividad física y alteraciones en la regulación del apetito, lo que contribuye al desarrollo de obesidad y síndrome metabólico (Robinson & Cols, 2017). En adultos, la evidencia también respalda que la restricción de sueño y la desalineación circadiana (por ejemplo, dormir en horarios no alineados con el ritmo biológico, como ocurre en el trabajo nocturno o con el uso excesivo de pantallas por la noche) favorecen el aumento de peso, la resistencia a la insulina y alteraciones hormonales (aumento de grelina, disminución de leptina) que promueven el apetito y la ingesta calórica (Takahashi & Cols, 2020).

Objetivo general: Relacionar el Estado Nutricional con el tiempo de uso de pantallas en adolescentes de 3ero a 6to año de la Escuela Secundaria Ramón Araujo durante el mes de junio de 2025.

Objetivos específicos:

- Determinar la prevalencia sobrepeso y obesidad en adolescentes de la escuela Ramón Araujo
- Evaluar la prevalencia de uso de pantallas en los adolescentes en la escuela Ramon Araujo
- Describir otros factores relacionados a la salud (actividad física, horas de sueño, alimentación) que puedan influir en el peso corporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevará a cabo un estudio cuantitativo, observacional descriptivo, de corte transversal.

Consideraciones éticas:

Este estudio cumplirá con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki y se adecuará a la normativa vigente en Argentina (Res. 1480/11 del Ministerio de Salud de la Nación).

Se solicitará autorización escrita a la dirección de la Escuela Secundaria Ramón Araujo para la realización del estudio en sus instalaciones.

Se entregará a los padres, madres o tutores legales de los estudiantes un consentimiento informado.

Se garantizará la confidencialidad de la información recogida, asegurando que los datos serán utilizados exclusivamente con fines académicos y científicos, sin

posibilidad de identificar individualmente a los participantes.

Solo formarán parte del estudio aquellos adolescentes cuyos padres/tutores hayan firmado el consentimiento y que acepten voluntariamente participar.

Población de estudio:

La población es de alumnos de 3ero a 6to de secundaria de la escuela periurbana Ramon Araujo, los cuales se encuentran en modalidad de estudios presencial.

a) Criterios de inclusión:

Se incluirá en el estudio a adolescentes que sean alumnos de tercero a sexto año de la Escuela Secundaria Ramón Araujo. También se incluirá únicamente a aquellos adolescentes que acepten participar en el estudio y cuyos padres o tutores legales firmen el consentimiento informado correspondiente para su participación.

b) Criterios de exclusión:

Se excluirá del estudio a los adolescentes que no se encuentren presentes al momento de la aplicación de la encuesta. No se incluirá a adolescentes embarazadas ni a aquellos que presenten enfermedades que pudieran causar obesidad de origen endógeno o secundario.

Las variables de estudio serán:

1. Edad: Se refiere al número de años cumplidos por el adolescente

al momento de realizar la encuesta. Es una variable cuantitativa discreta, que refleja la etapa del desarrollo en la que se encuentra cada participante. Su análisis permitirá observar posibles diferencias en el estado nutricional y los hábitos asociados según grupos etarios.

2. Sexo: Corresponde al sexo biológico declarado por el encuestado. Se registrará como una variable categórica dicotómica, con dos categorías: masculino y femenino. Su inclusión permitirá analizar posibles diferencias en las variables estudiadas según el sexo.
3. Año de escolaridad: Indica el curso que está cursando el adolescente dentro del nivel secundario al momento de la recolección de datos. Es una variable categórica ordinal, con las siguientes categorías: 3ro, 4to, 5to y 6to año de secundaria. Esta variable permitirá estratificar los resultados en función del nivel educativo, asociado indirectamente a la edad y a factores contextuales del entorno escolar.
4. Tiempo de uso de teléfono celular: Cantidad de horas diarias que un adolescente utiliza el celular ya

sea para actividades académicas, recreativas o sociales. Se medirá mediante un cuestionario autoadministrado en el que el adolescente declarará el tiempo promedio de uso diario. Los resultados se clasificaron en: Bajo uso: < 2 horas diarias, Moderado uso: 2 a 4 horas diarias, Alto uso: > 4 horas diarias.

5. Estado Nutricional: El estado nutricional es el resultado del equilibrio entre la ingesta de nutrientes y las necesidades del organismo. En adolescentes, refleja el grado en que el crecimiento y desarrollo corporal se están produciendo de forma adecuada. Se evaluará mediante el Índice de Masa Corporal (IMC), calculado como el peso en kilogramos dividido por la talla en metros al cuadrado (kg/m^2). La clasificación se realizará utilizando los percentiles establecidos por la SAP para adolescentes, según edad y sexo:
Bajo peso: $\text{IMC} < \text{percentil } 3$
Eutrófico (peso adecuado): IMC entre percentil 3 y 85
Sobrepeso: IMC entre percentil 85 y 97
Obesidad: $\text{IMC} \geq \text{percentil } 97$

6. Actividad física: Nivel de movimiento corporal realizado por el adolescente que contribuye al gasto energético. Se evaluará a través del cuestionario, midiendo la frecuencia semanal de actividad física moderada o intensa (≥ 60 minutos/día según OMS). Se clasificará en: Todos los días: ≥ 5 días a la semana, algunos días: < 5 días a la semana, raramente: < 2 días a la semana.
7. Consumo de comida chatarra: Frecuencia con la que el adolescente consume alimentos ultraprocesados o con bajo valor nutricional, como hamburguesas, papas fritas, snacks salados, golosinas, bebidas azucaradas y comidas rápidas. Se evaluará mediante el cuestionario, considerando la cantidad de días por semana en que se ingieren estos productos. se la clasificará en: Todos los días > 5 días a la semana - Algunos días 4 a 2 días a la semana - Raramente o nunca < 2 días a la semana
8. Cantidad de horas de sueño en un día de semana: La variable se describe como la cantidad promedio de horas que una persona duerme durante la noche en días laborables. Esta variable se categorizó en tres grupos:
Menos de 6 horas: Representa a las personas que duermen menos de seis horas por noche en días de semana;
Entre 6 a 8 horas: Incluye a aquellos que duermen entre seis y ocho horas por noche en días laborables, considerado el rango recomendado para adultos;
Más de 8 horas: Engloba a los individuos que duermen más de ocho horas por noche en días de semana.
9. Percepción sobre los efectos negativos del uso excesivo de pantallas en la salud a largo plazo: Se refiere a la creencia que tiene un individuo acerca de si el uso excesivo de dispositivos con pantallas puede generar consecuencias negativas en la salud física o mental a lo largo del tiempo. Se medirá a través de la pregunta de la encuesta: “¿Piensas que el uso excesivo de pantallas puede afectar a largo plazo la salud?” Es una variable categórica dicotómica, con dos posibles respuestas: Sí, cuando el encuestado considera que el uso excesivo de pantallas puede afectar la salud a largo plazo, y No, cuando el encuestado no cree que

tenga efectos negativos a largo plazo sobre la salud.

Procedimiento e instrumentos:

- Cuestionario sobre uso de dispositivos móviles y estilo de vida:

Diseñado para recolectar información de los adolescentes sobre el tiempo promedio diario de uso de pantallas (celulares, computadora, televisión), hábitos alimentarios, frecuencia de actividad física y horas de sueño. Incluirá también datos demográficos como edad, sexo, año de escolaridad. El cuestionario será autoadministrado en formato papel, con preguntas cerradas y algunas escalas de frecuencia.

- **Ficha de recolección de datos antropométricos:**

Formulario estructurado donde se registrará el peso, la talla y el cálculo del índice de masa corporal (IMC) de cada participante. Las mediciones se realizan con una balanza digital y un estadímetro portátil, siguiendo técnicas estandarizadas recomendadas por la SAP. Los valores obtenidos se compararán con las curvas de IMC según edad y sexo para clasificar el estado nutricional (eutrofico, sobrepeso, obesidad).

ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Se registrarán y procesarán los datos recolectados mediante tablas dinámicas de Microsoft Excel. Luego se realizarán gráficos en el mismo programa que respondan a los objetivos planteados.

RESULTADOS

Se realizaron 104 encuestas a los alumnos de tercero a sexto año de la Escuela Ramon Adrian Araujo a partir de las cuales se pudieron obtener los siguientes resultados:

Del total de 104 alumnos estudiados, un **54,8%** (n=57) corresponde al sexo femenino. El sexo masculino representa el **45,2%** de la muestra (n=47). (**Gráfico 1**)

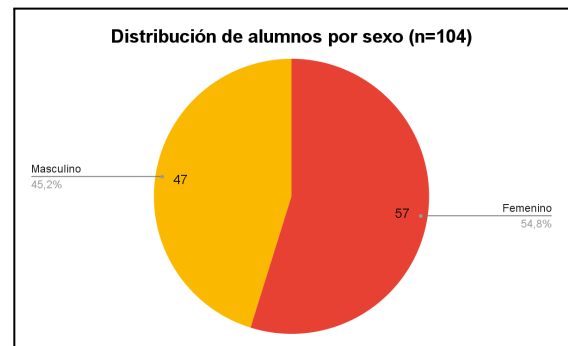


Gráfico n°1: Distribución por sexo de los alumnos estudiados (n=104).

Los estudiantes de **15 años** representan el grupo más numeroso, con un **26,9%** del total (n=28). Seguidos por los de **16 años**, que constituyen un **25%** (n=26). La edad de **14 años** también tiene una presencia significativa, con un **19,2%** (n=20). Mientras que los de **17 años**

corresponden al **20,2%** (n=21). En contraste, se observa una menor proporción de alumnos de **18 años**, con un **4,8%** (n=5). Y casos aislados de estudiantes de **13 años** (**1,9%**, n=2) y **19 años** (**1%**, n=1). (**Gráfico 2**)

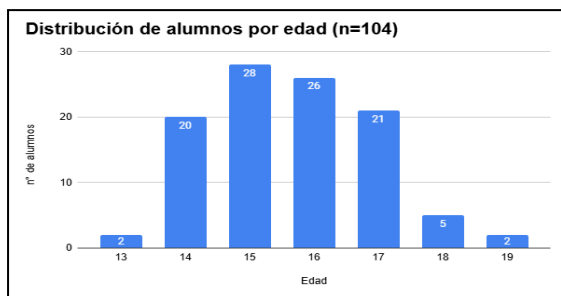


Gráfico n°2: Distribución por edad de los alumnos encuestados (n=104).

En cuanto al estado nutricional de los estudiantes, la mayoría, un **56,7%** (n=59) presentó un IMC adecuado para edad, es decir, eutrófico, pero de los alumnos restantes un **24,03%** (n=25) presentaba sobrepeso y un **17,30%** (n=18) obesidad, también se presentaron 2 alumnos con bajo peso. (**Gráfico 3**)

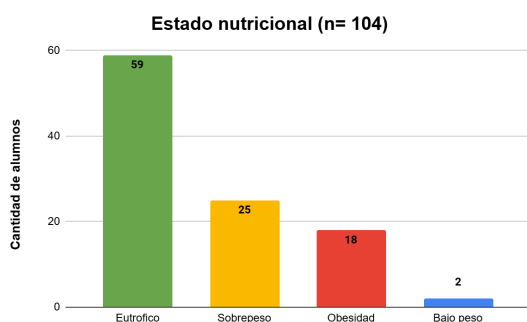


Gráfico n°3: Distribución del estado nutricional de los alumnos encuestados (n=104).

En el grupo femenino, el **57,1%** (n=32) presenta un peso adecuado, seguido por un **25%** (n=14) con sobrepeso y un **17,9%** (n=10) con obesidad. No se registraron casos de bajo peso en mujeres. En cuanto al grupo masculino, el **61,7%** (n=29) también presenta estado eutrófico, el **19,1%** (n=9) tiene sobrepeso, el **14,9%** (n=7) obesidad y solo un **4,3%** (n=2) presenta bajo peso. (**Gráfico 4**)

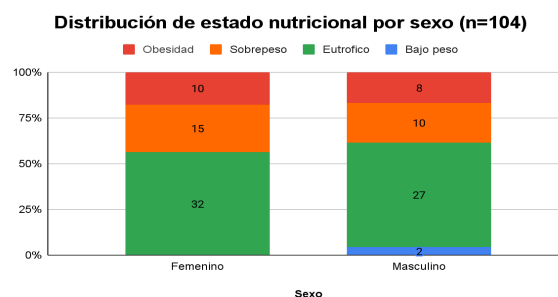


Gráfico n°4: Distribución de estado nutricional por sexo en los alumnos encuestados (n=104)

El dispositivo más utilizado fue el celular, siendo su uso superior a 4 horas diarias en el **43,3%** (n=45) de los entrevistados. Un **41,34%** (n=43) reportó una exposición moderada, es decir, entre 2 y 4 horas, sólo el **9,36%** (n=9) restante presentó un uso menor a 2 horas diarias. (**Gráfico 5**)

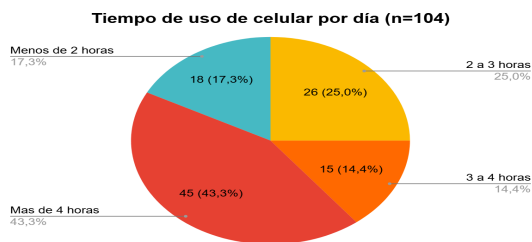


Gráfico n°5: Distribución del tiempo de uso de celular por día de los alumnos encuestados (n=104).

Del total de alumnos encuestados, el **41,3%** (n=43) realiza actividad física **algunos días a la semana**, mientras que un **29,8%** (n=31) afirma ejercitarse **todos los días**, y el **28,8%** (n=30) restante **raramente o nunca** realiza ejercicio. (Gráfico 6)

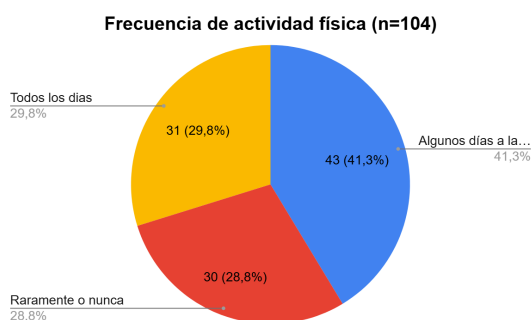


Gráfico n°6: Distribución de la frecuencia de actividad física de los alumnos encuestados (n=104).

En cuanto al descanso durante los días de semana, el **46,2%** (n=48) de los alumnos duerme entre **6 a 8 horas** diarias, mientras que el **41,3%** (n=43) duerme **menos de 6 horas**, y solo un **12,5%** (n=13) duerme **más de 8 horas**. (Gráfico 7).

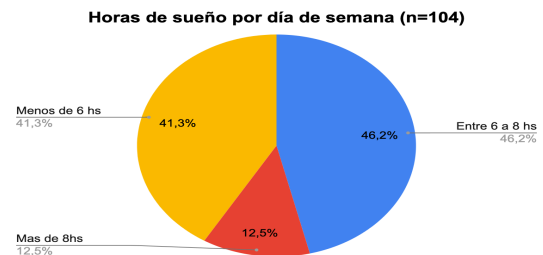


Gráfico n°7: Distribución de horas de sueño por día de semana en los estudiantes encuestados.

Respecto a los hábitos alimenticios, el **59,6%** (n=62) de los estudiantes consume comida chatarra **algunos días a la semana**, mientras que un **26,9%** (n=28) lo hace **todos los días**

y sólo un **13,5%** (n=14) afirma consumirla **raramente o nunca**. En contraste, el consumo de frutas y verduras es más equilibrado: el **45,2%** (n=47) de los alumnos las consume **todos los días**, el **44,2%** (n=46) **algunos días a la semana**, y solo un **10,6%** (n=11) **raramente o nunca** las incluye en su dieta. (Gráfico 8)

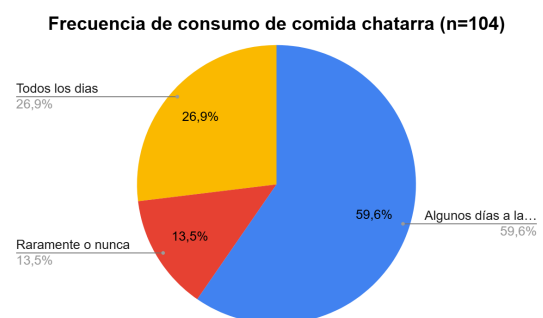


Gráfico n°8: Distribución de la frecuencia de consumo de comida chatarra de los estudiantes encuestados (n=104).

Se puede observar una relación entre el uso total de pantallas y el estado nutricional de los alumnos. A medida que aumenta el tiempo frente a pantallas, también tiende a aumentar la prevalencia de sobrepeso u obesidad. Entre los alumnos con obesidad, hasta un **50%** (n=14) usa pantallas más de 4 horas al día, y otro **25%** (n=5) entre 2 y 4 horas. Solo un tercio permanece por debajo de las 2 horas diarias. En contraste, los estudiantes con estado eutrófico (peso adecuado) se concentran en su mayoría en el rango de 2 a 3 horas (50%) y menos de 2 horas (48.9%). **(Gráfico 9)**

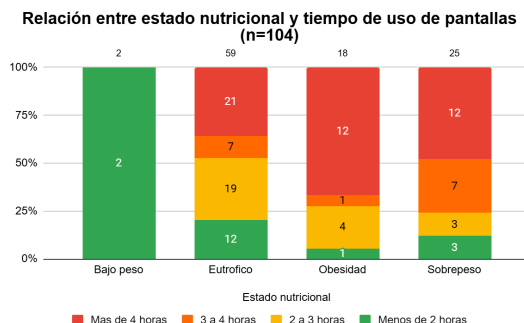


Gráfico n°9: Relación entre estado nutricional y tiempo de uso de pantallas de los alumnos encuestados (n=104).

Dentro del grupo con **estado eutrófico**, el **50%** (n=34) consume comida chatarra algunos días a la semana, el **25%** (n=17) lo hace todos los días y el **11,8%** (n=8) raramente o nunca. En el grupo con **sobrepeso**, el **47,1%** (n=16) consume

comida chatarra algunos días a la semana, el **17,6%** (n=6) todos los días y el **8,8%** (n=3) raramente o nunca. Entre quienes presentan **obesidad**, el **32,4%** (n=11) consume este tipo de alimentos algunos días a la semana, el **14,7%** (n=5) todos los días y el **5,9%** (n=2) raramente o nunca. En el grupo con **bajo peso**, solo se identificaron **dos estudiantes**: uno (n=1) que consume comida chatarra algunos días a la semana y otro (n=1) que la consume raramente o nunca. **(Gráfico n°10)**

Relación entre frecuencia de consumo de comida chatarra y estado nutricional (n=104)

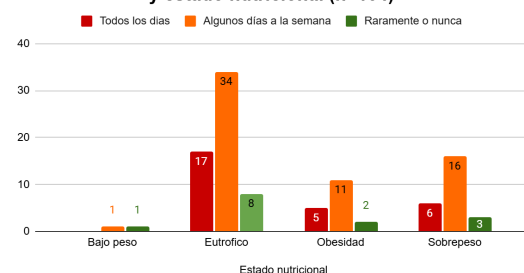


Gráfico n°10: Relación entre frecuencia de consumo de comida chatarra y estado nutricional (n=104).

En el grupo con **estado eutrófico**, el **25,9%** (n=27) realiza actividad física algunos días a la semana, el **17,3%** (n=18) todos los días y el **13,5%** (n=14) raramente o nunca. En el grupo con **sobrepeso**, el **9,6%** (n=10) realiza actividad física raramente o nunca, el **7,7%** (n=8) todos los días y el **6,7%** (n=7) algunos días a la semana. Entre los

estudiantes con **obesidad**, el **6,7% (n=7)** realiza actividad física algunos días a la semana, el **5,8% (n=6)** raramente o nunca y el **4,8% (n=5)** todos los días. En el grupo con **bajo peso**, el **1,9% (n=2)** realiza actividad física algunos días a la semana y ninguno lo hace todos los días ni nunca. **(Gráfico 11)**

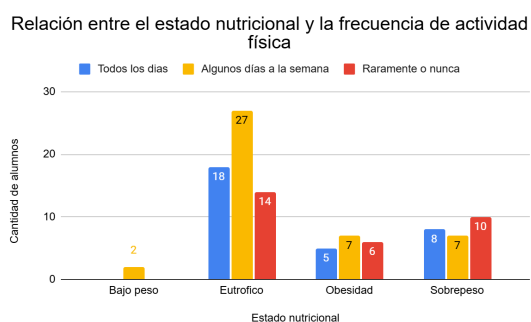


Gráfico n°11: Distribución de alumnos según su estado nutricional y la frecuencia con la que realizan actividad física. (n=104)

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio en la Escuela Secundaria Ramón Araujo revelan una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 41.33% (24.03% de sobrepeso y 17.30% de obesidad) en la población adolescente estudiada. Esta cifra es alarmantemente alta y, si bien es inferior al 51% reportado por el servicio de nutrición del Hospital de Niños de Tucumán para la población general de hasta 19 años, supera

significativamente la media de América Latina y el Caribe (30.6%) y la de Argentina (36.5%), que ya es la más alta de la región. La discrepancia con los datos hospitalarios locales podría deberse a que las muestras clínicas suelen concentrar casos de mayor complejidad, mientras que nuestro estudio refleja la realidad de un entorno escolar periurbano específico.

El objetivo principal de este trabajo fue relacionar el estado nutricional con el uso de pantallas, y los hallazgos demuestran una asociación clara y preocupante. Se observó una tendencia directamente proporcional: a mayor tiempo de exposición a pantallas, mayor es la prevalencia de sobrepeso y obesidad. Es particularmente notorio que en el grupo de adolescentes con obesidad, la mayoría reportó un uso de pantallas superior a las 4 horas diarias, mientras que los estudiantes eutróficos se concentraron en tiempos de uso inferiores. Este hallazgo está en consonancia con la evidencia científica internacional que identifica el tiempo frente a la pantalla como un factor de riesgo clave para la obesidad infantil. Nuestro análisis desglosado por dispositivo señala al teléfono celular como el principal contribuyente a este sedentarismo digital, con un 43.3% de los encuestados utilizándolo por más de 4 horas al día, a diferencia de la

computadora o la televisión, cuyo uso fue considerablemente menor.

Un aporte fundamental de este estudio es la vinculación del uso del celular con los patrones de sueño. En nuestra muestra, un 41.3% de los adolescentes duerme menos de 6 horas durante la semana, una cifra alarmante que, sumada al sedentarismo, potencia el riesgo de alteraciones metabólicas.

Además, el estudio identifica otros factores de estilo de vida que contribuyen a este panorama. Casi un tercio de los estudiantes (28.8%) rara vez o nunca realiza actividad física y un porcentaje similar (26.9%) consume comida chatarra todos los días. Si bien la relación entre el consumo de comida chatarra y el estado nutricional no mostró una tendencia tan marcada como el uso de pantallas, el alto consumo generalizado en todos los grupos, incluyendo a los eutróficos, sugiere que es un hábito extendido que crea una base de riesgo para toda la población.

Un hallazgo sociológico y de salud pública de gran relevancia es la brecha existente entre el conocimiento y el comportamiento. A pesar de que una abrumadora mayoría del 93.3% de los adolescentes reconoce que el uso excesivo de pantallas es perjudicial para la salud a largo plazo, casi la mitad de

ellos incurre en esta práctica. Esto subraya que las intervenciones no deben limitarse a la simple información, sino que deben abordar los factores ambientales, sociales y conductuales que impulsan estos hábitos. La sensibilización a la comunidad educativa y el desarrollo de estrategias escolares, propósitos centrales de este trabajo, se vuelven imperativos ante esta disonancia.

Es importante reconocer las limitaciones de nuestro estudio. Su diseño transversal permite identificar asociaciones, pero no establece causalidad. No podemos determinar si el uso de pantallas conduce al sobrepeso o si los adolescentes con sobrepeso tienden a ser más sedentarios. Además, los datos sobre estilo de vida se basaron en cuestionarios autoadministrados, lo que puede introducir sesgos de recuerdo o deseabilidad social. Finalmente, al tratarse de una muestra de una única escuela periurbana, los resultados deben generalizarse con cautela.

No obstante, las fortalezas del trabajo radican en el uso de mediciones antropométricas estandarizadas y en el análisis integral de múltiples factores de riesgo en una población específica. Los resultados obtenidos son un insumo valioso y concreto para la comunidad de la Escuela Ramón Araujo y para los

responsables de la salud pública en el área, reforzando la necesidad de implementar las intervenciones propuestas en la conclusión de este trabajo.

CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados obtenidos en la Escuela Ramón Adrián Araujo evidencian una preocupante prevalencia de sobrepeso y obesidad entre los alumnos de tercero a sexto año, asociada principalmente al uso excesivo de pantallas y a hábitos alimentarios poco saludables. Más del 40% de los estudiantes presenta algún grado de exceso de peso, y una gran proporción dedica más de 4 horas diarias al uso de dispositivos móviles, especialmente celulares, lo que promueve el sedentarismo. A esto se suma un consumo elevado de comida chatarra y una proporción significativa de alumnos con bajo nivel de actividad física y descanso insuficiente, factores que contribuyen de forma directa al deterioro del estado nutricional.

Estos hallazgos refuerzan la urgencia de implementar estrategias de prevención que aborden de manera integral los hábitos de vida de los adolescentes. Es necesario trabajar de forma articulada con la escuela, las familias y los equipos de salud para fomentar una alimentación

equilibrada, la práctica regular de ejercicio físico y un uso responsable de la tecnología.

Proponemos la realización de talleres interactivos que promuevan estilos de vida saludables, el diseño de campañas educativas adaptadas al nivel de comprensión de los estudiantes y la capacitación de docentes y padres para que actúen como agentes activos de cambio. Solo mediante un abordaje comunitario y sostenido será posible revertir esta tendencia y promover un desarrollo saludable en las nuevas generaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersen, T. O., Sejling, C., Jensen, A. K., et al. (2024). Self-reported and tracked nighttime smartphone use and their association with overweight and cardiometabolic risk markers. *Scientific Reports*, 14(1), 4861. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55349-2>
2. Bakour, C., Mansuri, F., Johns-Rejano, C., et al. (2022). Association between screen time and obesity in US adolescents: A cross-sectional analysis using National Survey of Children's Health 2016–2017. *PLOS ONE*, 17(12), e0278490.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278490>
3. Barnett, T. A., Kelly, A. S., Young, D. R., et al. (2018). Sedentary behaviors in today's youth: Approaches to the prevention and management of childhood obesity: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 138(11), e142–e159. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000591>
 4. Cáritas Española. (2022). *Impacto de las pantallas en la vida de la adolescencia y sus familias en situación de vulnerabilidad social: Realidad y virtualidad* (Colección Estudios e Investigaciones, n.º 23). Cáritas Española Editores. https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/publicaciones/catalogo/bibliotecaDigital/publicaciones/pdf/2022/202202_CARITAS_Informe_completo_Estudio_impacto_pantallas_vida_adolescencia_y_familias.pdf
 5. Carullo, N., Zicarelli, M., Michael, A., et al. (2023). Childhood obesity: Insight into kidney involvement. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17400. <https://doi.org/10.3390/ijms242417400>
 6. Chaput, J. P., McHill, A. W., Cox, R. C., Broussard, J. L., Dutil, C., da Costa, B. G. G., Sampasa-Kanyinga, H., & Wright, K. P. Jr. (2023). The role of insufficient sleep and circadian misalignment in obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(2), 82–97. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00747-7>
 7. de Ferranti, S. D., Steinberger, J., Ameduri, R., et al. (2019). Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 139(13), e603–e634. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000618>
 8. Engberg, E., Figueiredo, R. A. O., Rounge, T. B., Weiderpass, E., & Viljakainen, H. (2019). Heavy screen users are the heaviest among 10,000 children. *Scientific Reports*, 9(1), 11158. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46971-6>
 9. Etchegaray-Armijo, K., Fuentealba-Urra, S., & Bustos-Arriagada, E. (2023). Factores de riesgo asociados al sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes durante la pandemia por COVID-19 en Chile. *Revista Chilena de Nutrición*, 50(1), 56–65.

- <https://doi.org/10.4067/S0717-75182023000100056>
10. Flynn, J. T., Kaelber, D. C., Baker-Smith, C. M., et al. (2017). Clinical practice guideline for screening and management of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*, 140(3), e20171904.
<https://doi.org/10.1542/peds.2017-1904>
 11. Fung Fallas, M. P., Rojas Mora, E. J., & Delgado Castro, L. G. (2020). Impacto del tiempo de pantalla en la salud de niños y adolescentes. *Revista Médica Sinergia*, 5(6), e370.
<https://doi.org/10.31434/rms.v5i6.370>
 12. Gale, E. L., James Williams, A., & Cecil, J. E. (2024). The relationship between multiple sleep dimensions and obesity in adolescents: A systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, 73, 101875.
<https://doi.org/10.1016/j.smrv.2023.101875>
 13. Hall, W. L. (2025). Optimal sleep: A key element in maintaining a healthy bodyweight. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1–19.
<https://doi.org/10.1017/S0029665125000072>
 14. Hampl, S. E., Hassink, S. G., Skinner, A. C., et al. (2023). Clinical practice guideline for the evaluation and treatment of children and adolescents with obesity. *Pediatrics*, 151(2), e2022060640.
<https://doi.org/10.1542/peds.2022-060640>
 15. Kumar, S., & Kelly, A. S. (2017). Review of childhood obesity: From epidemiology, etiology, and comorbidities to clinical assessment and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(2), 251–265.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.017>
 16. Li, C., Cheng, G., Sha, T., Cheng, W., & Yan, Y. (2020). The relationships between screen use and health indicators among infants, toddlers, and preschoolers: A meta-analysis and systematic review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(19), 7324.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17197324>
 17. Lobstein, T., Baur, L., & Uauy, R. (2004). Childhood obesity: A growing pandemic. *Acta Paediatrica*, 93(Suppl 446), 31–36.

- <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2004.tb02830.x>
18. Ma, J., & Sheng, L. (2024). The effect of internet use on body weight in Chinese adolescents: Evidence from a nationally longitudinal survey. *PLOS ONE*, 19(12), e0311996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0311996>
 19. Marcus, C., Danielsson, P., & Hagman, E. (2022). Pediatric obesity—Long-term consequences and effect of weight loss. *Journal of Internal Medicine*, 292(6), 870–891. <https://doi.org/10.1111/joim.13547>
 20. Ministerio de Salud de la Nación. (2021). *Compromiso en la prevención de la obesidad*. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/el-ministerio-de-salud-de-la-nacion-reafirma-su-compromiso-en-la-prevencion-de-la-obesidad>
 21. Morales-Ghinaglia, N., & Fernandez-Mendoza, J. (2023). Sleep variability and regularity as contributors to obesity and cardiometabolic health in adolescence. *Obesity*, 31(3), 597–614. <https://doi.org/10.1002/oby.23667>
 22. Organización Mundial de la Salud. (2019). *Guidelines on physical activity, sedentary behaviour and sleep for children under 5 years of age*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550536>
 23. Organización Mundial de la Salud. (2025, mayo 7). *Obesidad y sobrepeso*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
 24. Pérez, M. A., López, J. D., & González, R. T. (2022). Asociación entre el tiempo de exposición a pantallas electrónicas y el índice de masa corporal en niños escolares. *Revista Española de Pediatría*, 78(4), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.pedi.2022.05.003>
 25. Robinson, T. N., Banda, J. A., Hale, L., et al. (2017). Screen media exposure and obesity in children and adolescents. *Pediatrics*, 140(Suppl 2), S97–S101. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-1758K>
 26. Rojas, L., Marchi, L., & Cañete, C. (2018). Prevalencia del uso de pantallas electrónicas y relación con el índice de masa corporal en pacientes que asisten al consultorio externo pediátrico de

- un hospital general. *Revista Pediatría*, 269, 13–18.
<https://revistapediatria.com.ar/wp-content/uploads/2018/07/269-04-Pr-evaluencia-del-uso-de-pantallas-electrónicas-y-relación-con-el-índice-de-masa-corporal.pdf>
27. Sánchez, M. A., & López, J. P. (2015). Obesidad infantil. *Revista Médica de Clínica Las Condes*, 26(4), 456–462.
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=67381>
28. Sánchez-Rojas, A. A., García-Galicia, A., Vázquez-Cruz, E., Montiel-Jarquín, Á. J., & Aréchiga-Santamaría, A. (2022). Self-image, self-esteem and depression in children and adolescents with and without obesity. *Gaceta Médica de México*, 158(3), 118–123.
<https://doi.org/10.24875/GMM.M22000653>
29. Sassine, S., Ilinca, A. P., Coltin, H., et al. (2025). Impact of obesity on outcome in children diagnosed with cancer in Canada: A report from Cancer in Young People in Canada. *Cancer*, 131(2), e35673.
<https://doi.org/10.1002/cncr.35673>
30. Seo, S. H., & Shim, Y. S. (2019). Association of sleep duration with obesity and cardiometabolic risk factors in children and adolescents: A population-based study. *Scientific Reports*, 9(1), 9463.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45951-0>
31. Shuvo, S. D., & Biswas, B. K. (2023). The degree of association between overweight and obesity with the use of electronic media among Bangladeshi adolescents. *PLOS ONE*, 18(1), e0280544.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280544>
32. Sociedad Argentina de Pediatría. (2021). *Guías para su abordaje clínico. Consenso sobre obesidad* (1^a ed.).
https://www.rehueong.com.ar/sites/default/files/2022-02/Consenso%20ObesidadGu%C3%ADas%20para%20su%20abordaje%20cl%C3%A9nico%20Sociedad%20Argentina%20de%20Pediatr%C3%ADa_0.pdf
33. Takahashi, M., Shimamoto, T., Matsumoto, L., Mitsui, Y., Masuda, Y., Matsuzaki, H., Hasumi, E., Bujo, C., Niimi, K., Nishikawa, T., Wada, R., & Yamamichi, N. (2025). Short sleep duration is a significant risk factor of obesity: A multicenter observational study of healthy adults in Japan. *PLOS ONE*, 20(3),

- e0319085.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0319085>
34. UNICEF. (2023). *Reporte sobrepeso niñez América Latina y Caribe* 2023.
<https://www.unicef.org/lac/media/43026/file/Reporte%20sobrepeso%20ninez%20america%20latina%20caribe%202023%20UNICEF.pdf>
35. Verduci, E., Bronsky, J., Embleton, N. D., Mis, N. F., Milani, G. P., Vriezinga, S. L., ... Szajewska, H. (2021). Role of dietary factors, food habits, and lifestyle in childhood obesity development: A position paper from the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 72(5), 769–783.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003075>
36. Woo Baidal, J. A., Locks, L. M., Cheng, E. R., Blake-Lamb, T. L., Perkins, M. E., & Taveras, E. M. (2016). Risk factors for childhood obesity in the first 1,000 days: A systematic review. *American Journal of Preventive Medicine*, 50(6), 761–779.
<https://doi.org/10.1016/j.amepre.2015.11.01>

Financiamiento y Agradecimientos

La presente investigación se llevó a cabo sin financiamiento externo ni remuneración para los participantes, dado que la colaboración de los investigadores se enmarca en una pasantía formativa de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Tucumán..

El equipo de investigación desea expresar su más sincero agradecimiento a la Dra. Daniela Valdez Abadía por su valiosa orientación y acompañamiento a lo largo de todo el proyecto. Su asesoramiento voluntario y su apoyo académico fueron fundamentales. Agradecemos al personal administrativo y docente de la Escuela Ramon Araujo por abrir sus puertas para la realización de este estudio lo cual facilitó en gran medida la logística del proyecto y nos brindó una experiencia agradable.

Se reconoce el esfuerzo y la dedicación de todos los miembros del equipo: Juan Caballero, Hugo Cuozzo, Lautaro Díaz, Tomás García Cárdenas, Melisa García Lobo, Mijail Kotowicz y María Paula Morales, cuya participación fue fundamental para la realización de este trabajo.

39.- Salud humana

La administración de progesterona regula la expresión de factores relacionados con la neuroinflamación en un modelo murino de endometriosis inducida

Autora: Rojas, Carla Sabrina; rojascarlasabrina@gmail.com

Co-autoras: Casais, Marilina; mcasais@unsl.edu.ar; Delsouc, María Belén;
mbdelsouc@unsl.edu.ar; Vallcaneras, Sandra; ssvallca@unsl.edu.ar; Zabala, Ana Sofía;
asofia.zabala@gmail.com

Orientadora: Vallcaneras, Sandra; ssvallca@unsl.edu.ar

Universidad Nacional de San Luis / Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia

Resumen

La endometriosis (EDT) es una enfermedad crónica dependiente de estradiol, caracterizada por la presencia anormal de tejido endometrial fuera del útero. Estas lesiones endometriósicas responden a hormonas sexuales, lo que provoca microhemorragias, generando un foco inflamatorio-oxidativo constante y dolor persistente. La terapia basada en progestinas es el tratamiento de primera línea para el control del dolor en la mayoría de las mujeres con EDT, aunque su mecanismo de acción no se ha dilucidado por completo. En este estudio evaluamos el efecto de progesterona sobre la inflamación, neurogénesis y estrés oxidativo en un modelo murino de EDT inducida quirúrgicamente mediante autotrasplante de tejido uterino al mesenterio intestinal. A partir del día 1 postquirúrgico, los animales del grupo de control ($n = 7$) recibieron 100 μ l de aceite de maíz estéril, mientras que los animales del grupo experimental ($n = 7$) recibieron 50 μ g/100 μ l de progesterona por vía subcutánea, administrada diariamente durante 1 mes. Se analizaron los niveles de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1) en fluido peritoneal mediante ELISA, y en lesiones se evaluaron la expresión génica del ARNm de *Pgp9.5*, *Tac1* y *Cgrp* (RT-qPCR), y marcadores de estrés oxidativo (técnicas espectrofotométricas). Los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba *t* de Student ($p < 0,05$). La progesterona no afectó los niveles de IL-1 β , la expresión de *Cgrp* ni los marcadores de estrés oxidativo. Sin embargo, redujo TNF- α ($p < 0,01$), TGF- β 1 ($p < 0,05$), *Pgp9.5* ($p < 0,01$) y *Tac1* ($p < 0,05$). En este modelo murino, progesterona moduló factores neuroinflamatorios vinculados a la EDT, aportando evidencia preclínica sobre su posible efecto en el alivio del dolor y la inflamación.

Palabras clave: endometriosis, progesterona, neuroinflamación

Introducción

La endometriosis (EDT) es una afección ginecológica crónica, dependiente de estradiol (E_2), que se caracteriza por la presencia anormal de glándulas endometriales y estroma fuera del útero. Estos implantes endometriósicos responden a hormonas sexuales y originan microsangrados que producen un foco inflamatorio-oxidativo constante. Además, suele formarse tejido cicatricial y adherencias que alteran la anatomía normal de la pelvis.

La EDT afecta aproximadamente al 10% de las mujeres en edad reproductiva en todo el mundo. Además, es una enfermedad crónica sin cura definitiva, que requiere tratamiento de por vida. Su manejo debe ser individualizado según síntomas, edad, historia clínica y deseo reproductivo, priorizando la reducción del dolor, inflamación, estrés y comorbilidades, así como la mejora de la calidad de vida (Allaire et al., 2023). Las opciones incluyen cirugía, terapia hormonal, antiinflamatorios no esteroides y enfoques complementarios como acupuntura, medicina herbaria, fisioterapia y cambios dietéticos (Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia, 2019). Tiene una presentación heterogénea, sin embargo, las manifestaciones clínicas más frecuentes suelen ser dolor pélvico crónico,

dispareunia, disuria, dismenorrea y subfertilidad (Bulun et al., 2019; Lamceva et al., 2023). Uno de los componentes característicos en su fisiopatología es el desbalance hormonal. Las lesiones endometriósicas presentan sobreexpresión de la enzima P450 aromatasa y, en consecuencia, concentraciones elevadas de E_2 , en comparación con el endometrio eutópico de mujeres sanas (Delvoux et al., 2009). E_2 tiene efectos antiapoptóticos, proangiogénicos y proinflamatorios en las células endometriales, los cuales están exacerbados en EDT. Por su parte, progesterona (P_4) es necesaria para contrarrestar la proliferación inducida por E_2 y, aunque se han reportado alteraciones en los niveles de expresión de las isoformas de su receptor, la terapia basada en progestinas (hormonas sintéticas que imitan a P_4) es el tratamiento de primera línea para controlar el dolor en la mayoría de las mujeres con EDT (Bulun 2009; Buggio et al., 2017; Vannuccini et al., 2022). Tal efecto es mediado por la supresión o atenuación de la ovulación, sin embargo, su mecanismo de acción aún no se encuentra completamente dilucidado. La EDT se reconoce como una afección inflamatoria ya que las lesiones endometriósicas reclutan células inmunes que liberan citoquinas al microambiente peritoneal. Entre las citoquinas más representativas involucradas en su

patogenia se encuentran el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y la interleuquina 1β (IL- 1β) (Cho et al., 2018).

El dolor es el síntoma más frecuente en pacientes con EDT y cada vez existe más evidencia que respalda la relación entre el dolor y las fibras nerviosas asociadas al tejido endometriósico. En comparación con el endometrio eutópico, las lesiones ectópicas peritoneales suelen presentar una mayor densidad de fibras nerviosas positivas para el producto del gen proteico P.5 (PGP 9.5), un marcador pan-neuronal altamente específico que se utiliza para identificar y analizar la presencia, cantidad y distribución de fibras nerviosas (Liu et al. 2023). La inervación aberrante característica de la EDT, promovida por los niveles elevados de E_2 y la secreción anómala de diversas citoquinas, media la inflamación neurogénica asociada con la enfermedad, a la vez que la inflamación generada refuerza la inervación aberrante (Tokushige et al., 2006; Miller et al., 2015; García-Gómez et al., 2020; Wei et al., 2020). La inflamación neurogénica es un tipo específico de inflamación mediada por la activación de nociceptores, que son fibras nerviosas sensoriales especializadas en la detección de estímulos dolorosos o nocivos. En este proceso, las fibras sensoriales, especialmente las C y A δ , se activan por la

inflamación y otros eventos nocivos, liberando neuropéptidos con funciones inflamatorias y nociceptivas, como la sustancia P (SP, un neuropéptido de la familia de las taquicininas) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). En la EDT, tanto SP como CGRP se encuentran elevados en el microambiente circundante y, junto con el neurotransmisor gaseoso y vasodilatador óxido nítrico (NO), aumentan la permeabilidad vascular localizada. Es relevante destacar que la activación de las fibras sensoriales promueve el reclutamiento de células inmunes y la posterior liberación de citoquinas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , NGF e IL- 1β , contribuyendo así a un estado crónico de inflamación neurogénica. Por lo tanto, la interacción entre la inflamación y la inervación puede agravar la EDT y está estrechamente relacionada con el dolor asociado a esta patología (Wu et al., 2017; Maddern et al., 2020; Wei et al., 2020; Velho et al., 2023).

El estrés oxidativo, también contribuye al desarrollo de la EDT, debido a un sistema de defensa antioxidante menos activo y niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (ROS) que activan factores de transcripción como NF- κ B, perpetuando la respuesta inflamatoria. Además, estas ROS inducen la activación de vías clave de señalización para la proliferación de células endometriales ectópicas e incluso

provocan modificaciones epigenéticas que pueden agravar las características patológicas de la enfermedad (Huang et al., 2025).

Aunque se han logrado avances en la comprensión de la EDT, el rol de la P_4 en esta enfermedad continúa siendo un aspecto poco comprendido, tal como se mencionó anteriormente, por lo que resulta necesario profundizar en el estudio de sus efectos locales, con especial interés en los factores neurales e inflamatorios-oxidativos, que presentan un papel clave en el mantenimiento del microambiente endometriótico, y en la generación del dolor asociado a la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general: Estudiar la influencia de P_4 sobre factores que participan en la progresión de la EDT en un modelo murino.

Objetivos específicos: Investigar, en ratones C57BL/6 con EDT inducida, el efecto de P_4 sobre:

- La expresión de factores implicados en el proceso inflamatorio ($TNF-\alpha$, $TGF-\beta_1$ e $IL-1\beta$) y en el proceso neurogénico sensitivo de las lesiones endometrióticas (*Ppg9.5*, *Tac1* y *Cgrp*).
- El estado oxidativo de las lesiones se evaluó mediante la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), así como mediante el análisis del marcador de peroxidación lipídica malondialdehído (MDA).

Materiales y Métodos

Modelo animal: Se trabajó con ratones hembras de la especie *Mus musculus*, cepa C57BL/6, de dos meses de edad y con un peso de 19-21 g. Los mismos fueron endocriados en el Bioterio de la Universidad Nacional de San Luis (San Luis, Argentina), bajo condiciones rigurosas de iluminación (período de 12 h de luz y 12 h de oscuridad), temperatura controlada ($22\pm 2^\circ\text{C}$), con agua y alimento estéril *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo con la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (National Institutes of Health, NIH) y pautas del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de San Luis, Argentina, bajo el Protocolo #B-262.

Inducción quirúrgica de la EDT: La EDT fue inducida experimentalmente mediante autotrasplante de tejido endometrial en el mesenterio intestinal. Para ello, los animales fueron previamente anestesiados por vía intraperitoneal con 100 mg/kg de

ketamina y 10 mg/kg de xilacina, y se les realizó una incisión ventromedial para exponer los intestinos. El cuerno uterino derecho fue ligado en ambos extremos, removido del animal y dividido longitudinalmente. Luego, fue cortado en tres piezas cuadradas de 4 mm² y cada una fue suturada al mesenterio del intestino. Por último, se procedió a cerrar la pared abdominal.

Diseño experimental: De manera aleatoria, se seleccionaron 7 animales por grupo. Las hembras del grupo control recibieron inyección subcutánea diaria de 100 µl de aceite de maíz filtrado estéril (vehículo) y los animales del grupo experimental recibieron inyección subcutánea diaria de P₄ (P0130, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 50 µg/100 µl de vehículo (Mönckedieck et al., 2009), durante 4 semanas, comenzando en el día 1 postoperatorio. Una vez transcurrido el mes, fueron eutanizados por dislocación cervical. A continuación, se realizó un pequeño ojal medioventral y, a través del mismo, se inyectó 1,5 ml de buffer fosfato salino (PBS) estéril en la cavidad peritoneal de cada animal, recolectando el fluido peritoneal (FP) y centrifugando el mismo a 250 g durante 10 min para recoger el sobrenadante. Después, se abrió completamente el abdomen para acceder a las lesiones endometriósicas, las cuales fueron conservadas a -80°C. El FP también

fue recolectado y almacenado a -80 °C hasta su procesamiento.

Determinación de la concentración de TNF-α, TGF-β1 e IL-1β en FP: Se realizó empleando los siguientes kits comerciales: Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA (Cat. #DY410, R&D Systems), Mouse TGF-β1 DuoSet ELISA (Cat. #DY1679-05, R&D Systems), y Mouse IL-1β ELISA MAXTM Deluxe Set (Cat. #432604, BioLegend) respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de ARN y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR): El ARN total se aisló utilizando el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Las muestras de ARN se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro de microplacas EPOCH™ (BioTek Instruments, Inc.). La pureza de las mismas se determinó midiendo la densidad óptica a 260/280 nm. Para identificar la integridad del ARN, se realizó una electroforesis de las muestras en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed™ (Biotium), para la visualización de las bandas de ARNr 28S y 18S. Todas las muestras de ARN intactas se trataron con ADNasa libre de ARNasa RQ1 (Promega). El ARN total (1 µg) se retrotranscribió en ADNc usando *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Diagnostics

International Ltd.), siguiendo las pautas del fabricante. Para la qPCR, se amplificó el ADNc utilizando el equipo ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems) y el kit *FastStart™ Universal SYBR® Green Master* (Roche Diagnostics International Ltd.). La mezcla de reacción constó de 2xFastStart™ Universal SYBR® Green Master Mix, ADNc, cebadores (en concentración 10 µM) y agua libre de nucleasas en un volumen final de 20 µL. La información de todos los primers utilizados se describe en la **Tabla 1**. Se utilizó el gen *Rn18s* (ARN ribosómico 18S) como referencia interna. Las condiciones de ciclado de la PCR fueron: 95 °C, 10 min; 40 ciclos a 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min. La expresión relativa se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabla 1. Nombre oficial de los genes, secuencias de los primers utilizados, códigos de GenBank® y tamaños de los respectivos amplicones.

Gen	Secuencias (5'-3')	Código de GenBank	Tamaño del amplicón
<i>Pgp9.5</i>	Forward: CAACCAAGA CAAGTGGAA TTT Reverse: TCTCGAAAC ACTTGGCTC TATC	NM_011670. 2	101 pb
<i>Tac1</i>	Forward: CATGGCCAG	NM_009311. 3	100 pb

	ATCTCTCAC AAA Reverse: GCATCGCGC TTCTTTCATA AG		
<i>Cgrp</i>	Forward: CCCCAAGAA TGAAGTTA CACA Reverse: TGTCAAAGG GAGAAGGGT TTT	NM_001033 954	138 pb
<i>Rn18s</i>	Forward: CTGAGAAAC GGCTACCAC ATC Reverse: GCCTCGAAA GAGTCCTGT ATTG	NR_003278. 3	107 pb

Abreviaturas: *Pgp9.5*, producto génico proteico 9.5; *Tac1*, precursor 1 de taquicinas; *Cgrp*, péptido relacionado al gen de la calcitonina; *Rn18s*, ARN ribosómico 18S. Los códigos fueron obtenidos desde el sitio web oficial de GenBank®:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Actividad de las enzimas antioxidantes:

Las lesiones (una por animal) se homogeneizaron en un medio que contenía 120 mM de KCl, 30 mM de buffer fosfato (pH 7,4) y un cóctel inhibidor de proteasas al 1% (P8340, Sigma-Aldrich). Las suspensiones se centrifugaron a 21.912 g durante 15 min a 4 °C para eliminar los núcleos y los restos celulares. Los sobrenadantes se utilizaron para analizar la actividad de CAT, SOD y GPx. La concentración de proteína total se midió mediante el método de Bradford, utilizando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-

Aldrich) como estándar. La actividad de CAT se determinó midiendo la disminución de la absorción del H_2O_2 a 240 nm. Una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima necesaria para descomponer 1 μM de H_2O_2 /min. La actividad de SOD se determinó empleando el método de autooxidación de pirogallol, controlando el cambio de absorbancia a 420 nm por minuto. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima requerida para inhibir la autooxidación del pirogallol en un 50%. La actividad de GPx se determinó monitoreando la oxidación de NADPH a 340 nm durante 1 minuto, en un medio de reacción que contenía GSH 0,2 mM, GSH reductasa 0,25 U/ml, ter-butil hidroperóxido 0,5 mM y buffer fosfato 50 mM (pH 7,2). Tras adicionar la preparación enzimática (50 μl), se calculó la diferencia con respecto a los valores basales. Los resultados se expresaron como unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína (U/mg de proteína). Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Medición de TBARS-MDA: La peroxidación lipídica en homogenato de lesiones endometriósicas se evaluó espectrofotométricamente midiendo los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) a 535 nm. Este método se basó en la reacción de MDA, un producto final de la peroxidación lipídica, con ácido tiobarbitúrico (TBA). Para ello se

realizó una curva de calibración utilizando 1,1,3,3-tetraetoxipropano como estándar y los resultados se expresaron como μmol de MDA/mg de proteína. Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico: Se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism (Versión 5, GraphPad Software Inc. San Diego SA). Los valores se presentaron como la media $\pm$ S.E.M. Las diferencias entre las medias de los dos grupos se analizaron mediante la prueba *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados y discusión

El entorno hormonal característico de la EDT, dominado por los estrógenos y con resistencia a la acción de P_4 , se asocia con alteraciones en la modulación inmune, la inflamación y la neurogénesis (García-Gómez et al., 2020). Aunque esta resistencia sugiere una disfunción en la señalización de P_4 , las progestinas han demostrado eficacia clínica en el alivio del dolor, lo que indica que concentraciones farmacológicas elevadas podrían superar parcialmente estos defectos (Buggio et al., 2017; Marquardt et al., 2019; Nagy et al., 2021). No obstante, muchos aspectos del papel de P_4 en EDT continúan siendo objeto de investigación.

Con el fin de analizar el efecto de P_4 sobre la expresión de factores implicados en el proceso inflamatorio y neurogénico sensitivo, en el primer objetivo específico, se planteó el análisis de los niveles proteicos de $TNF-\alpha$, $TGF-\beta 1$ e $IL-1\beta$ en FP de ratones con EDT inducida, mediante ELISA. Los resultados obtenidos demuestran que los niveles proteicos de $TNF-\alpha$ y $TGF-\beta 1$ disminuyen en el grupo tratado con P_4 , respecto al grupo control ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 1. A y B**), mientras que no se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de $IL-1\beta$ (**Figura 1. C**).

Estos hallazgos reflejan el potencial efecto antiinflamatorio de la P_4 , lo cual respalda el uso de progestinas como tratamiento de primera línea para el dolor asociado a la EDT (Buggio et al., 2017; Vannuccini et al., 2022). El descenso de $TNF-\alpha$, una citoquina clave en la inflamación, angiogénesis y mantenimiento de fibras nerviosas funcionales (McKinnon et al., 2012), junto con la disminución de $TGF-\beta 1$, involucrado en fibrosis e inflamación, sugiere una modulación del microambiente endometriósico con posible impacto sobre la progresión de la enfermedad y la percepción del dolor (Tamburro et al., 2003; Rocha et al., 2017; Young et al., 2017).

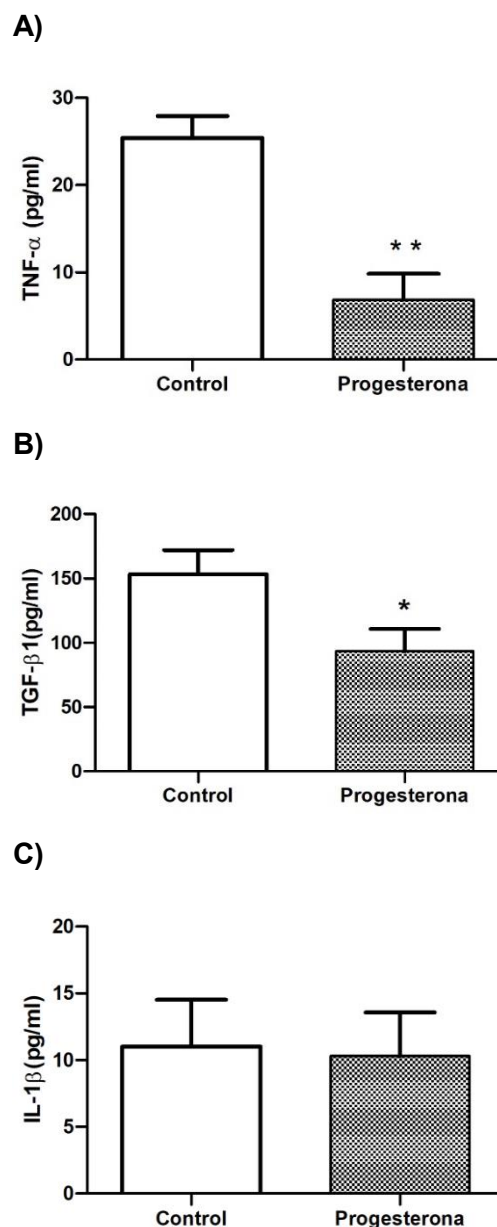


Figura 1. Efecto de progesterona sobre los niveles de $TNF-\alpha$, $TGF-\beta 1$ e $IL-1\beta$ en FP de ratones C57BL/6 con endometriosis inducida. Los resultados se expresan como media $\pm$ S.E.M. de 7 animales/grupo. Para el análisis de datos, se utilizó la prueba t de Student. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

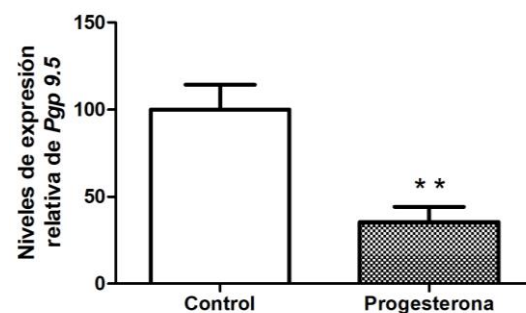
Continuando con el abordaje del primer objetivo específico, se evaluó la expresión de genes relacionados con la inervación de las lesiones. En primer lugar, por medio de

RT-qPCR, se analizó la expresión de *Pgp9.5*, el cual actúa como un marcador general de fibras nerviosas. Luego, se analizó la expresión del ARNm de dos factores implicados en el proceso neurogénico sensitivo: *Tac1* y *Cgrp*. En los resultados obtenidos se pudo observar una reducción en la expresión de *Pgp9.5* y *Tac1* en el grupo tratado con P_4 con respecto al grupo control ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 2. A y B**), mientras que no se observaron cambios significativos en la expresión de *Cgrp* (**Figura 2. C**).

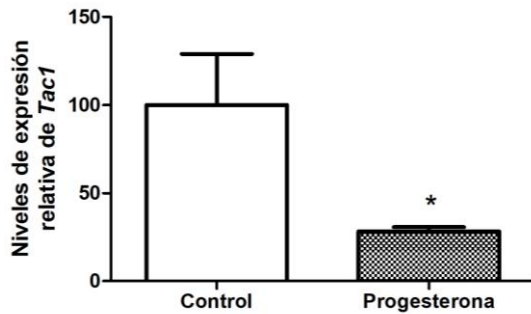
Estos hallazgos concuerdan con lo reportado en pacientes con EDT, donde el tratamiento con progestinas y anticonceptivos orales combinados reduce la densidad de fibras nerviosas (Tokushige et al., 2009). En nuestro estudio observamos que P_4 disminuyó la expresión génica de *Pgp9.5*, sugiriendo menor inervación de las lesiones. Asimismo, aunque no se observó un cambio en la expresión de *Cgrp*, se encontró una disminución significativa en la expresión de *Tac1*, lo que indicaría una reducción en la inervación sensitiva de las lesiones en comparación con el grupo control. Estos resultados respaldan el papel de P_4 en el alivio del dolor asociado a la EDT, en línea con lo observado en un modelo de ratas por Alvarez et al. (2012), quienes demostraron que la inyección intralesional de P_4 , administrada tres semanas después de la

implantación quirúrgica de tejido uterino en el músculo gastrocnemio, inhibía la hiperalgesia asociada. Dado que SP participa tanto en la transmisión nociceptiva como en la liberación de citoquinas proinflamatorias, incluyendo $TNF-\alpha$ y en la inhibición de mediadores antiinflamatorios (Maddern et al., 2020; Wei et al., 2020), su disminución en EDT podría contribuir a interrumpir el ciclo de inflamación y dolor característico de la enfermedad. Además, considerando que SP ha sido asociada a procesos de fibrogénesis en la EDT (Liu et al., 2019), la reducción en la expresión de *Tac1*, e incluso también de la citoquina profibrótica $TGF-\beta 1$, abre la posibilidad de que P_4 impacte sobre la remodelación tisular, aunque este aspecto requiere verificación experimental. En conjunto, estos resultados aportan evidencia de que P_4 modula simultáneamente los componentes inflamatorio y neurogénico de las lesiones endometriósicas, procesos que se retroalimentan y contribuyen a la generación del dolor crónico característico de la enfermedad.

A)



B)



C)

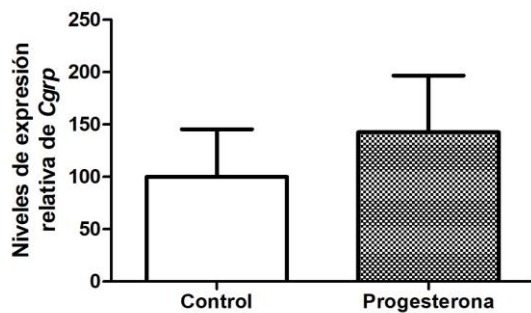


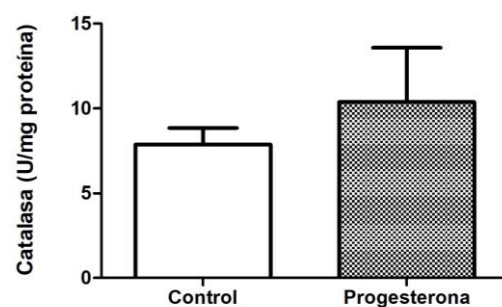
Figura 2. Efecto de progesterona sobre la expresión del ARNm de *Pgp9.5*, *Tac1* y *Cgrp* en lesiones endometriósicas de ratones C57BL/6 con endometriosis inducida. Los resultados se expresan como media $\pm$ S.E.M. de 7 animales/grupo. Para el análisis de datos se utilizó la prueba t de Student. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Como se mencionó, el estrés oxidativo es un proceso clave en la fisiopatología de la EDT, mediado por niveles elevados de ROS que favorecen la inflamación en el microambiente peritoneal, entre otros efectos clave (Huang et al., 2025). Por ello, como parte del segundo objetivo específico se investigó el impacto de P_4 sobre la actividad de las enzimas antioxidantes

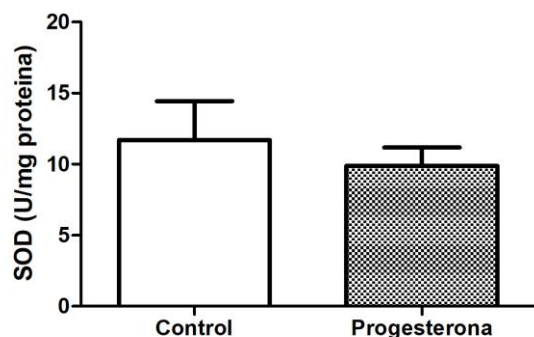
CAT, SOD y GPx, y la concentración de MDA, un producto de la peroxidación lipídica, mediante técnicas espectrofotométricas. Los resultados obtenidos de la actividad de las enzimas CAT, SOD y GPx, no mostraron cambios estadísticamente significativos en los animales tratados con P_4 , respecto del grupo control (**Figura 3. A, B y C**). En relación al marcador de peroxidación lipídica TBARS-MDA, tampoco se observaron cambios significativos entre los grupos estudiados (**Figura 3. D**).

Estos resultados indicarían que, en este modelo experimental, a diferencia de su efecto sobre la inflamación y la innervación, P_4 no ejerce una influencia significativa sobre los marcadores de estrés oxidativo analizados. Estos datos destacan la necesidad de explorar terapias combinadas que aborden de forma integral tanto el componente inflamatorio y neural como el oxidativo de la enfermedad, especialmente considerando la correlación positiva entre estrés oxidativo y dolor en pacientes con EDT.

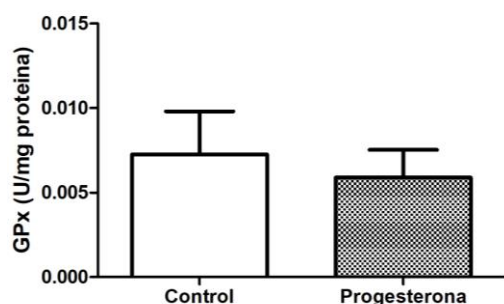
A)



B)



C)



D)

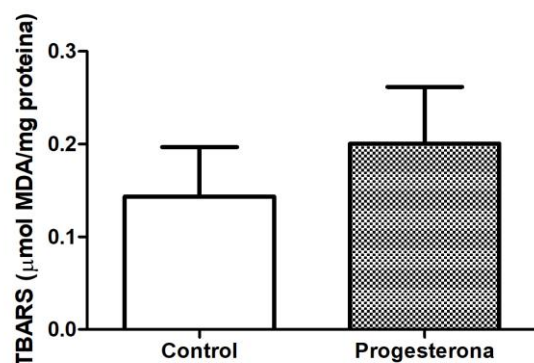


Figura 3. Efecto de progesterona sobre marcadores de estrés oxidativo en lesiones endometriósicas de ratones C57BL/6 con endometriosis inducida. Los resultados se expresan como media $\pm$ S.E.M. de 7 animales/grupo. Para el análisis de datos, se utilizó la prueba *t* de Student.

En nuestro modelo experimental, observamos que P_4 es efectiva para modular la inflamación y la inervación

alterada, lo que sugiere su efectividad en la reducción del dolor. No obstante, no afecta el volumen de la lesión endometriósica (Paoletti-Geuna, 2018) ni el estrés oxidativo. Estos hallazgos sugieren que podría ser beneficioso combinar el tratamiento de progestinas junto con otras estrategias terapéuticas, como antioxidantes u otros agentes que complementen sus efectos. En este sentido, los estudios de Zheng et al., (2023) y Dymanowska-Dyjak et al., (2024) respaldan el potencial de la suplementación con vitaminas y otros antioxidantes, como curcumina, melatonina y resveratrol, en el tratamiento de la EDT. Estos compuestos han demostrado reducir la gravedad de la dismenorrea, mejorar la dispareunia y el dolor pélvico, así como frenar la progresión de la lesión, lo que se traduce en una mejor calidad de vida para las pacientes. Por otro lado, los hallazgos de Patiño-García et al., (2023) en un estudio *in vitro* indican que el estetrol, un estrógeno natural producido por el hígado fetal humano, eleva los niveles de receptores de progesterona (PR), lo que potencia la respuesta a P_4 y, a su vez, inhibe la proliferación y migración celular. Además, estudios recientes con este estrógeno, llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en un modelo murino *in vivo*, evidenciaron una reducción del volumen y peso de las lesiones

endometriósicas, acompañada de un aumento en el número de células apoptóticas, una modulación del estrés oxidativo y un incremento en la peroxidación lipídica, favoreciendo la regresión de la lesión. Asimismo, se observó una disminución en los niveles de TNF- α (Zabala et al., 2024). Por otro lado, se ha demostrado que la combinación de estetrol con drospirenona, una progestina sintética similar a P₄, alivió la intensidad del dolor en pacientes con EDT (Harada et al., 2024).

Conclusiones

Este trabajo refuerza la evidencia sobre el papel de P₄ en la modulación de la inflamación y la inervación alterada en la EDT, lo que puede contribuir a la reducción del dolor. Asimismo, la posibilidad de potenciar su eficacia mediante combinaciones con antioxidantes o moduladores hormonales abre nuevas perspectivas en el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas. Estos hallazgos destacan la importancia de seguir explorando enfoques integrados que aborden los múltiples mecanismos fisiopatológicos de la EDT y permitan mejorar la calidad de vida de las pacientes.

Bibliografía

Allaire, C., Bedaiwy, M. A., & Yong, P. J. (2023). Diagnosis and

management of endometriosis.

CMAJ: Canadian Medical

Association Journal, 195(10),

E363–E371.

<https://doi.org/10.1503/cmaj.220637>

Alvarez, P., Chen, X., Hendrich, J., Irwin, J. C., Green, P. G., Giudice, L. C., & Levine, J. D. (2012). Ectopic uterine tissue as a chronic pain generator. *Neuroscience*, 225, 269–282.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.033>

Buggio, L., Somigliana, E., Barbara, G., Frattaruolo, M. P., & Vercellini, P. (2017). Oral and depot progestin therapy for endometriosis: towards a personalized medicine. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(15), 1569–1581.
<https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1381086>

Bulun, S. E. (2009). Endometriosis. *The New England Journal of Medicine*, 360(3), 268–279.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0804690>

Bulun, S. E., Yilmaz, B. D., Sison, C., Miyazaki, K., Bernardi, L., Liu, S., ... Wei, J. (2019). Endometriosis. *Endocrine Reviews*, 40(4), 1048–

1079.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00242>
- Cho, Y. J., Lee, S. H., Park, J. W., Han, M., Park, M. J., & Han, S. J. (2018). Dysfunctional signaling underlying endometriosis: current state of knowledge. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(3), R97–R113.
<https://doi.org/10.1530/JME-17-0227>
- Delvoux, B., Groothuis, P., D’Hooghe, T., Kyama, C., Dunselman, G., & Romano, A. (2009). Increased production of 17beta-estradiol in endometriosis lesions is the result of impaired metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(3), 876–883.
<https://doi.org/10.1210/jc.2008-2218>
- Dymanowska-Dyjak, I., Frankowska, K., Abramiuk, M., & Polak, G. (2024). Oxidative imbalance in endometriosis-related infertility—the therapeutic role of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6298.
<https://doi.org/10.3390/ijms25126298>
- Federación Argentina de Sociedades de Ginecología y Obstetricia (FASGO). (2019). *Actualización de consenso de endometriosis*.
https://www.fasgo.org.ar/archivos/consensos/Actualizacion_de_Consenso_Endometriosis_2019.pdf
- García-Gómez, E., Vázquez-Martínez, E. R., Reyes-Mayoral, C., Cruz-Orozco, O. P., Camacho-Arroyo, I., & Cerbón, M. (2020). Regulation of inflammation pathways and inflammasome by sex steroid hormones in endometriosis. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 935.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00935>
- Harada, T., Kobayashi, T., Hirakawa, A., Takayanagi, T., Nogami, M., Mochiyama, T., ... Osuga, Y. (2024). Efficacy and safety of the combination of estetrol 15 mg/drospirenone 3 mg in a cyclic regimen for the treatment of endometriosis-associated pain and objective gynecological findings: A multicenter, placebo-controlled, double-blind, randomized study. *Fertility and Sterility*, 122(5), 894–901.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2024.07.011>

- Huang, L., Shi, L., Li, M., Yin, X., & Ji, X. (2025). Oxidative stress in endometriosis: Sources, mechanisms and therapeutic potential of antioxidants (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 55, 72. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2025.513>
- Lamceva, J., Uljanovs, R., & Strumfa, I. (2023). The main theories on the pathogenesis of endometriosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4254. <https://doi.org/10.3390/ijms24054254>
- Liu, D., Liu, M., Yu, P., & Li, H. (2023). Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor expression in endometriosis: A systematic review and meta-analysis. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 62(5), 634–639. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2023.07.003>
- Liu, X., Yan, D., & Guo, S. W. (2019). Sensory nerve-derived neuropeptides accelerate the development and fibrogenesis of endometriosis. *Human Reproduction*, 34(3), 452–468. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey392>
- Maddern, J., Grundy, L., Castro, J., & Brierley, S. M. (2020). Pain in endometriosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 590823. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.590823>
- Marquardt, R. M., Kim, T. H., Shin, J. H., & Jeong, J. W. (2019). Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: What goes wrong in endometriosis? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3822. <https://doi.org/10.3390/ijms20153822>
- McKinnon, B., Bersinger, N. A., Wotzkow, C., & Mueller, M. D. (2012). Endometriosis-associated nerve fibers, peritoneal fluid cytokine concentrations, and pain in endometriotic lesions from different locations. *Fertility and Sterility*, 97(2), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.11.011>
- Miller, E. J., & Fraser, I. S. (2015). The importance of pelvic nerve fibers in endometriosis. *Women's Health*, 11(5), 611–618. <https://doi.org/10.2217/whe.15.47>
- Mönckedieck, V., Sannecke, C., Husen, B., Kumbartski, M., Kimmig, R.,

- Tötsch, M., ... Grümmer, R. (2009). Progesterins inhibit expression of MMPs and of angiogenic factors in human ectopic endometrial lesions in a mouse model. *Molecular Human Reproduction*, 15(10), 633–643.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gap063>
- Nagy, B., Szekeres-Barthó, J., Kovács, G. L., Sulyok, E., Farkas, B., Várnagy, Á., Vértés, V., Kovács, K., & Bódis, J. (2021). Key to life: Physiological role and clinical implications of progesterone. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11039.
<https://doi.org/10.3390/ijms222011039>
- Paoletti Geuna, G. (2019). *Efecto de progesterona sobre el desarrollo de lesiones endometriósicas en un modelo murino* (Trabajo Final de grado). Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis.
- Patiño-García, D., Palomino, J., Pomés, C., Celle, C., Torres-Estay, V., & Orellana, R. (2023). Estetrol increases progesterone genetic response without triggering common estrogenic effects in endometriotic cell lines and primary cultures. *Biomedicines*, 11(4), 1169.
<https://doi.org/10.3390/biomedicine11041169>
- Rocha, A. L., Vieira, E. L., Ferreira, M. C., Teixeira, A. L., & Reis, F. M. (2017). Tumor necrosis factor and its soluble receptors as potential diagnostic markers of endometriosis. *Journal of Endometriosis and Pelvic Pain Disorders*, 9(4), 275–278.
<https://doi.org/10.5301/jepdpd.5000306>
- Tamburro, S., Canis, M., Albuisson, E., Dechelotte, P., Darcha, C., & Mage, G. (2003). Expression of transforming growth factor beta1 in nerve fibers is related to dysmenorrhea and laparoscopic appearance of endometriotic implants. *Fertility and Sterility*, 80(5), 1131–1136.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(03\)01182-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)01182-8)
- Tokushige, N., Markham, R., Russell, P., & Fraser, I. S. (2009). Effect of progestogens and combined oral contraceptives on nerve fibers in peritoneal endometriosis. *Fertility and Sterility*, 92(4), 1234–1239.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1774>

- Vannuccini, S., Clemenza, S., Rossi, M., & Petraglia, F. (2022). Hormonal treatments for endometriosis: The endocrine background. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 23(3), 333–355.
<https://doi.org/10.1007/s11154-021-09666-w>
- Young, V. J., Ahmad, S. F., Duncan, W. C., & Horne, A. W. (2017). The role of TGF- β in the pathophysiology of peritoneal endometriosis. *Human Reproduction Update*, 23(5), 548–559.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dm-x016>
- Velho, R. V., Sehouli, J., & Mechsner, S. (2023). Mechanisms of peripheral sensitization in endometriosis patients with peritoneal lesions and acyclical pain. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 308(4), 1327–1340.
<https://doi.org/10.1007/s00404-023-07110-9>
- Zabala, A. S., Conforti, R. A., Delsouc, M. B., Filippa, V., Montt-Guevara, M. M., Giannini, A., ... Casais, M. (2024). Estetrol inhibits endometriosis development in an in vivo murine model. *Biomolecules*, 14(5), 580.
<https://doi.org/10.3390/biom14050580>
- Wei, Y., Liang, Y., Lin, H., Dai, Y., & Yao, S. (2020). Autonomic nervous system and inflammation interaction in endometriosis-associated pain. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 80.
<https://doi.org/10.1186/s12974-020-01752-1>
- Zheng, S. H., Chen, X. X., Chen, Y., Wu, Z. C., Chen, X. Q., & Li, X. L. (2023). Antioxidant vitamins supplementation reduce endometriosis related pelvic pain in humans: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 21(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01126-1>
- Wu, J., Xie, H., Yao, S., & Liang, Y. (2017). Macrophage and nerve interaction in endometriosis. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 53.
<https://doi.org/10.1186/s12974-017-0828-3>

Financiamiento

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología de la Reproducción (LaBiR), IMIBIO-SL CONICET, FQByF,

UNSL, y formó parte del Trabajo Final de la Lic. Rojas para la Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Los recursos financieros provinieron de la Universidad Nacional de San Luis [PROICO CyT-UNSL 2-0720], el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) [PIP 969], y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) [PICT-2020-SERIEA-03793], Argentina.

39: Salud Humana

5'-tiARN-Gly como biomarcador seminal en reproducción asistida: análisis comparativo de cuantificación por ddPCR y RT-qPCR

Autores: Velásquez Sabrina¹, Grosso Julieta Belen¹, Octavio Borri^{1 2}, Calvo Karina³, Spinelli Silvana Virginia¹

Orientador/a: Spinelli Silvana Virginia; E. mail: spinelli@idicer-conicet.gob.ar

Universidad Nacional de Rosario - IDICER

1 INSTITUTO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA Y EXPERIMENTAL DE ROSARIO (IDICER),

2 FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS, CÁTEDRA DE FISIOLOGÍA HUMANA,
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO, ARGENTINA.

3 CENTRO MÉDICO PROAR

Resumen

La infertilidad afecta a aproximadamente el 15% de las parejas a nivel mundial. El análisis seminal tradicional ofrece información limitada para evaluar la fertilidad masculina, especialmente en casos de infertilidad masculina inexplicada. En nuestro laboratorio investigamos el potencial de fragmentos derivados de ARNt, como biomarcadores para evaluar la calidad seminal en procedimientos de reproducción asistida (ART). Estas moléculas cumplen funciones relevantes en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos, influyendo de manera significativa en la función reproductiva.

El objetivo principal de este trabajo fue optimizar la detección de estas moléculas, específicamente 5'-tiARN-Gly, en plasma seminal mediante *droplet digital PCR* (ddPCR) y comparar su desempeño con la cuantificación por RT-qPCR. Si bien la RT-qPCR es el método convencional para medir niveles de ARN pequeños, sufre de alta variabilidad y baja reproducibilidad, frecuentemente debido a la presencia de proteínas contaminantes e inhibidores químicos que afectan la actividad de la Taq polimerasa y el apareamiento de cebadores. La ddPCR, en cambio, permite la cuantificación absoluta y presenta una alta tolerancia a inhibidores, ofreciendo ventajas claras frente a las limitaciones de la RT-qPCR.

Se realizó un estudio prospectivo en el Centro Médico PROAR (2015–2021) con muestras de hombres normozoospermicos que participaron en ciclos de ICSI con ovocitos donados. Las cuantificaciones mostraron que la ddPCR superó a la RT-qPCR en tasas de detección y sensibilidad, posicionándose como una técnica más robusta y confiable para la medición de tiARNs en contextos clínicos de reproducción asistida.

Palabras claves: tiARN, infertilidad masculina, biomarcadores seminales

INTRODUCCIÓN

La infertilidad, definida como la incapacidad de una pareja sexualmente activa y sin uso de anticonceptivos para lograr el embarazo en el transcurso de un año, afecta aproximadamente al 15% de las parejas a nivel mundial, con el factor masculino implicado en cerca del 50% de los casos. El abordaje diagnóstico y terapéutico es complejo, dada la interacción de múltiples determinantes genómicos, proteómicos y metabolómicos que contribuyen de manera única en cada individuo (Kovac et al., 2013).

Las causas de infertilidad masculina incluyen alteraciones morfológicas o funcionales del aparato reproductor, disfunciones en la espermatogénesis, trastornos endocrinos, infecciones del tracto genital y obstrucciones de los conductos. Si bien se han desarrollado nuevas metodologías de evaluación, como el análisis de la fragmentación del ADN, estudios de estrés oxidativo y pruebas genéticas, su implementación clínica se ve limitada por la ausencia de consenso, estandarización y valores de referencia. En consecuencia, la evaluación de rutina continúa basándose en la historia clínica, el examen físico y el análisis seminal (Gül et al., 2024).

El espermograma, aunque accesible y no invasivo, presenta bajo valor predictivo debido a la variabilidad intra e interindividual y a la falta de representación

poblacional en sus parámetros de referencia. Además, no evalúa la capacidad funcional de los espermatozoides. Cuando los resultados son normales y no se identifican causas femeninas, se diagnostica infertilidad masculina inexplicada (UMI, por sus siglas en inglés) (Hamada et al., 2011).

La búsqueda de biomarcadores más precisos es esencial. Un biomarcador se define como una característica objetivamente medible que indica un proceso biológico normal, patológico o una respuesta terapéutica (Palmer et al., 2013). Su valor clínico aumenta si puede obtenerse mediante procedimientos no invasivos y si permite una detección temprana de la patología. En este contexto, los biomarcadores moleculares —incluyendo ARNs pequeños (sARNs)— han cobrado relevancia en infertilidad masculina.

Los sARNs, no codificantes, estables y abundantes en plasma seminal (PS), comprenden microARNs (miARNs), piwi-ARNs (piARNs) y fragmentos derivados de ARNt (tsARNs). Análisis bioinformáticos de bases públicas de sRNA-seq en PS de varones normozoospermicos revelaron que el 88% de las secuencias corresponden a tsARNs, originados por escisión específica de ARNt mediada por endonucleasas (Kumar et al., 2016; Lyons et al., 2017). Estas moléculas interactúan con proteínas y ARNm, modulando la

traducción, regulando la expresión génica y participando en procesos epigenéticos (Balatti et al., 2017).

En función del sitio de escisión del ARNt, los tsARNs se clasifican en 5'-tiARNs, 3'-tiARNs, 5'-tRFs, 3'-tRFs y tsARNs anticodón (Joshi et al., 2023). Los tiARNs derivan de la acción de la angiogenina (ANG), una ribonucleasa secretada reconocida por su papel en la angiogénesis. ANG escinde ARNt citoplasmáticos maduros en su bucle anticodón, generando tiARNs de manera no convencional (Lyons et al., 2017, 2018). Durante condiciones de estrés, su producción aumenta y, además de cumplir funciones intracelulares, estas moléculas se liberan al medio extracelular (Kumar et al., 2016; Lyons et al., 2018). El patrón de susceptibilidad a la escisión y el repertorio resultante de tiARNs parecen depender tanto del tipo celular como de la naturaleza del estímulo.

En trabajos previos, nuestro grupo evaluó la presencia de 5'-tiARNs en PS de pacientes normozoospermicos sometidos a ICSI con ovodonación, empleando RT-qPCR. Se observó que niveles elevados de 5'-tiARN-Glu y 5'-tiARN-Lys se asociaron a fallos de implantación, particularmente en pacientes con múltiples intentos infructuosos (Grosso et al., 2021). Sin embargo, la elevada variabilidad entre muestras remarcó la necesidad de métodos analíticos más robustos y

reproducibles para su uso como biomarcadores clínicos.

En este sentido, la droplet digital PCR (ddPCR) representa una alternativa tecnológica ventajosa frente a la RT-qPCR para la cuantificación de ácidos nucleicos. La ddPCR se basa en la partición de la mezcla de reacción en hasta 20.000 microgotas estables gracias a un aceite con surfactantes. Cada gota actúa como una microreacción independiente que puede contener o no la molécula diana. Tras la amplificación por PCR a punto final, un lector especializado discrimina las gotas positivas —con fuerte fluorescencia por clivaje de sondas TaqMan— de las negativas. La proporción de gotas positivas permite calcular la concentración absoluta del blanco, corrigiendo estadísticamente la distribución molecular mediante el modelo de Poisson (Hindson et al., 2011).

Las ventajas de la ddPCR incluyen cuantificación absoluta sin necesidad de curvas estándar, alta tolerancia a inhibidores de la PCR, generación masiva de réplicas técnicas y límites de detección bajos. Esto la convierte en una herramienta idónea para detectar variaciones mínimas en moléculas de baja abundancia, como ciertos tsARNs, ofreciendo un potencial significativo para mejorar el diagnóstico y la estratificación de pacientes en reproducción asistida (Baettig et al., 2023).

OBJETIVOS

El presente trabajo plantea como objetivos optimizar la cuantificación de 5'-tiARNs seminales mediante la técnica de *droplet digital* PCR y comparar los resultados obtenidos por *droplet digital* PCR con los generados mediante RT-qPCR, con el propósito de determinar si la primera constituye un método superador para la cuantificación de 5'-tiARNs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos de estudio

Los pacientes con diversas patologías reproductivas fueron seleccionados por la Dra. Karina Calvo (bioquímica del Laboratorio de alta complejidad de PROAR) de entre los individuos que concurrieron al Centro Médico PROAR y que se encontraban realizando tratamientos de reproducción asistida en la institución. En ese marco, el seguimiento de todos los pacientes fue realizado por médicos especialistas del Centro Médico PROAR, quienes registraron los datos de la historia clínica del paciente, realizaron el examen físico y solicitaron los estudios bioquímicos pertinentes. Asimismo, el equipo médico realizó los tratamientos de reproducción asistida e informó su evolución. En todos los casos, la incorporación de las personas se efectuó una vez que otorgaron su libre consentimiento a participar. El presente proyecto cuenta con la aprobación del

Comité de Bioética de la Facultas de Ciencias Médicas de la UNR (expte n° 44487/0004).

Se incorporaron voluntarios con parámetros espermáticos superiores al quinto percentil según el manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010), que se sometieron a tratamientos de ICSI y utilizaron óvulos de donantes (con el objeto de minimizar los posibles factores de infertilidad femenina). Estos pacientes fueron clasificados en tres grupos de acuerdo con los resultados del procedimiento de reproducción asistida:

- ICSI (+): grupo control constituido por individuos que lograron el embarazo clínico mediante ICSI.

Los pacientes que no lograron el embarazo clínico mediante dicho tratamiento, ICSI (-), se clasificaron en:

- 1FIC: pacientes que realizaron un solo procedimiento de ICSI y obtuvieron un resultado negativo.
- +2FIC: pacientes que realizaron dos o más procedimientos de ICSI con resultados negativos, en los que se presume infertilidad masculina inexplicada.

Para este trabajo se analizaron las muestras de semen de 59 pacientes normozoospermicos que se sometieron a un tratamiento de ICSI utilizando óvulos de donantes en el centro médico PROAR entre los años 2015 a 2021. A estos

pacientes se les solicitó hacer uso del remanente de la muestra remitida en el marco de su tratamiento, ya que normalmente se procesa una fracción de la misma y el resto es desechado.

Las características clínicas generales de los pacientes como son la edad, índice de masa corporal (IMC) y resultados de los procedimientos de ICSI fueron extraídas de las historias clínicas por el personal del Centro médico PROAR. El análisis de semen fue realizado por el equipo Bioquímico de PROAR de acuerdo con las normas del Manual de la Organización Mundial de la Salud. Los parámetros seminales que se midieron incluyeron concentración espermática (espermatozoides $\times 10^6/\text{mL}$), porcentaje de vitalidad y porcentaje de motilidad. La valoración de los embriones obtenidos por ICSI fue realizada por el equipo bioquímico responsable del Laboratorio de alta complejidad de PROAR en base a la clasificación del Consenso de Estambul. Se consideró embarazo la presencia de saco gestacional mediante ecografía en la sexta semana.

Procesamiento inicial de las muestras

Las muestras de semen se obtuvieron por masturbación con una abstinencia no mayor a 5 días y se dejaron licuar por al menos 30 minutos a 37°C . Cada muestra fue procesada antes de la hora de recolección, se homogeneizó, se separó

parte de la muestra para realizar gradiente de densidad y obtener espermatozoides seleccionados para ICSI. El resto de la muestra no utilizada se centrifugó 5 minutos a 1500 g para la obtención de PS libre de células. El PS se preservó en nitrógeno líquido hasta su traslado a un freezer de -70°C .

Extracción de ARN de plasma seminal

La extracción de ARN de PS se llevó a cabo incorporando modificaciones al protocolo estándar de extracción de ARN con TRI Reagent® (Molecular Research Center, MRC, Inc), como se describe en Grosso et al 2020.

Retrotranscripción de ARNs pequeños

La síntesis de ADNc a partir de los ARNs pequeños se llevó a cabo utilizando la técnica de *stem-loop* RT (SLO-RT) descrita por Chen y colaboradores (Chen et. al., 2005). La RT se realizó con la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Se utilizó un cebador SLO específicos para 5'-tiARN-Gly (5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCGAGA - 3') y las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl según instrucciones del fabricante.

Cuantificación mediante qPCR

La amplificación por qPCR de 5'-tiARN^{Gly} se realizó empleando la mezcla HOT FIREpol EvaGreen Plus (Solis Biodyne), en el sistema StepOne-Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación se emplearon los siguientes cebadores: cebador directo: 5'-GGCGGAGCATTGGTGGTTCAGTGGTA GAAT -3', cebador reverso: 5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3', en una concentración final de 0,25 µM de cada uno.

La homogeneidad y especificidad del producto de PCR obtenido fue confirmada mediante análisis de curvas de desnaturalización. La cuantificación se llevó a cabo utilizando una curva estándar construida con ADNc sintetizado a partir del 5'-tiARN sintético. Las mismas constan de cinco puntos, con un rango de concentración entre 100.000 y 10 UA.

Cuantificación mediante *droplet digital* PCR

La generación de las gotas se llevó a cabo empleando el sistema Automated Droplet Generator (Bio-Rad) y la lectura de la fluorescencia de las gotas se realizó con el sistema droplet digital PCR QX200 (Bio-Rad).

El fluoróforo utilizado para la sonda TaqMan fue FAMTM, y BHQ1 el *quencher*. Las secuencias de los cebadores

empleados son las siguientes: cebador directo: 5'-GGTGGTTCAGTGGTA-3', cebador reverso: 5'-CAGGGTCCGAGGTA-3', sonda TaqMan: 5'-FAM-CGTCTCCTCTGGTGCG-BHQ1-3'.

El protocolo de ddPCR utiliza la mezcla ddPCR Supermix for probes (Bio-Rad), que contiene todos los elementos necesarios para la reacción, a excepción de los cebadores para la PCR, la sonda TaqMan y el molde de ADNc. En todos los experimentos de ddPCR se colocaron 11 uL de Supermix, una mezcla de cebadores 18 uM de cada uno, para una concentración final de entre 900 nM y 1,2 uM de cada uno, sonda TaqMan, para una concentración final de entre 450 y 750 nM y volúmenes variables de ADNc de 5'-tiRNA-Gly. En los casos que fue necesario se llevó a volumen final de 22 uL con agua. Luego de la generación de las gotas, el volumen final de reacción en todos los casos fue de 40 uL, por la adición del aceite que emulsiona la mezcla.

La fase de amplificación por PCR a punto final comenzó con un paso de 30 segundos a 95 °C, y continuó con entre 40 y 50 ciclos comprendidos por un paso de 15 segundos a 95 °C, otro de 60 segundos en un rango de temperaturas de 50 a 60 °C, en el cual se hibridan los cebadores, y una elongación de entre 1 y 2 minutos a 60 °C. Finalizó con una etapa de 10 minutos a 98 °C, para desnaturalizar la enzima. Luego

de la amplificación los tubos se incubaron ON a 12 °C, para estabilizar las mezclas, práctica que permite una mejor lectura de la fluorescencia de las gotas.

La determinación del número de copias/20 uL de las muestras se llevó a cabo verificando que la separación de las nubes de amplificación y blanco fuera clara, y el valor final de la cuantificación se determinó mediante la corrección de cada muestra en función de la dilución realizada.

Análisis estadístico

Las comparaciones de la edad y los parámetros seminales de los pacientes pertenecientes a cada grupo fueron realizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis. El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0.05$. Las comparaciones de los niveles de cada ARN pequeño entre los distintos grupos de pacientes se efectuaron por medio de la prueba U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0.05$.

RESULTADOS

Características generales de los grupos de estudio y análisis de datos clínicos

Dada la dificultad de identificar a los pacientes que padecen UMI, el presente trabajo se enmarca en un estudio prospectivo, en el cual los pacientes son clasificados en función del éxito o fracaso de sus procedimientos de ICSI realizados. Se incluyeron 59 pacientes

normozoospermicos que se sometieron a uno o más tratamientos de ICSI por ovodonación en el Centro Médico PROAR, entre los años 2015 y 2021. Los óvulos donados provinieron de mujeres jóvenes, con fertilidad conocida y buen estado de salud. Las mujeres receptoras fueron menores de 50 años de edad, sin antecedentes de endometriosis. Tal como se describió en la sección Materiales y métodos, los pacientes se dividieron en tres grupos de acuerdo al resultado de sus procedimientos de ICSI.

Se realizó un relevamiento de las historias clínicas de todos los pacientes incluidos en este trabajo, y se clasificaron en los tres grupos de estudio, quedando conformados de la siguiente manera: 31 individuos pertenecen al grupo ICSI (+), y 28 al grupo ICSI (-), el cual está compuesto por 17 pacientes del subgrupo 1FIC y 11 pacientes del subgrupo +2FIC.

En la Tabla I se exponen las características clínicas de los grupos de estudio analizados. Se incluyeron los datos obtenidos en el espermograma: concentración espermática ($\times 10^6$ /mL), porcentaje de vitalidad y porcentaje de motilidad. Como puede observarse, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos en lo que respecta a los parámetros seminales analizados. Esto evidencia que los pacientes son normozoospermicos, y que el resultado obtenido en el procedimiento

de ICSI no está influenciado por anomalías en los parámetros seminales.

Tabla I. Características clínicas de los grupos de estudio				
	ICSI (+) (n=25)	1FIC (n=11)	+2FIC (n=9)	P
Edad	40 (11.5)	39 (4)	36.5 (10)	ns
Parámetros seminales				
Concentración espermática (10 ⁶ /mL)	76 (53)	55 (84)	91 (88)	ns
Vitalidad espermática (%)	85 (14)	89 (14)	84 (12)	ns
Motilidad espermática (%)	62 (14)	68 (13)	66 (8)	ns
ICSI (+): pacientes con resultados positivos en ICSI. 1FIC: pacientes con resultado negativo en un solo procedimiento de ICSI. +2FIC: pacientes con dos o más fallas en procedimientos de ICSI, posible UMI. ns: no significativo. Los valores se expresan como mediana y rango intercuartil.				

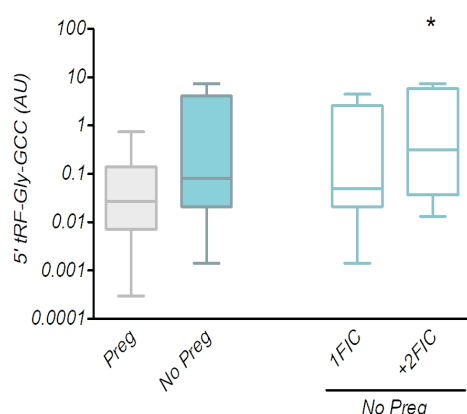
Cuantificación de 5'-tiRNAGly en muestras de plasma seminal por RT-qPCR

Con el objetivo de validar resultados preliminares del laboratorio se evaluó si existen diferencias significativas entre los niveles de 5'-tiARN-Gly en el plasma seminal de esta nueva cohorte de pacientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1. Como puede observarse, no se hallaron diferencias

significativas entre los grupos al realizar comparaciones de a pares con el grupo ICSI (+) (prueba *U* de Mann-Whitney, nivel de significación del 5%). Esto difiere de los resultados preliminares del laboratorio publicados en Grosso et al 2020. Sin embargo, el grupo ICSI (-) muestra una tendencia a niveles mayores comparado con el grupo ICSI (+). Esta tendencia también se observa para el subgrupo +2FIC. Los niveles de este 5'-tiARN muestran una gran variabilidad en todos los grupos, con valores que oscilan entre cuatro y cinco órdenes de magnitud. A su vez, los niveles de detección para este transcripto fueron de un 76.3 % (45 muestras detectas vs 14 no detectadas), dato que pone en evidencia las limitaciones de esta técnica. Todo esto es una consecuencia de la diversidad natural de las muestras de plasma seminal, influida por factores fisiológicos y ambientales únicos para cada individuo, lo que se suma a las limitaciones del método de detección, el grado de degradación de las muestras y el ruido experimental. El deterioro de las muestras puede explicarse al considerar la antigüedad de un subconjunto de ellas, algunas de las cuales tienen más de cinco años desde su procesamiento. Otras posibles causas del deterioro del ARN pueden asociarse con el descongelamiento por desperfectos en el freezer de -80°C en el que se almacenan, y la falta de habilidad

en la manipulación de las muestras durante la extracción del ARN.

A



B

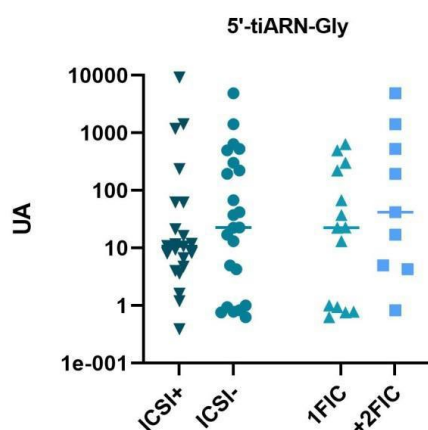


Figura 1. Niveles de 5'-tiARN-Gly en muestras de PS de pacientes normozoospermicos determinados mediante RT-qPCR de las cohorte 2015-2019 (n=42) (A, imagen extraída de Grosso et al, 2020, 5'-tRF-Gly-GCC corresponden a 5'-tiARN-Gly) y 2015-2021 (n=59) (B). ICSI (+): pacientes con procedimiento exitoso de ICSI. ICSI (-): pacientes con uno o más procedimientos fallidos de ICSI. 1FIC: pacientes con un procedimiento fallido de ICSI. +2FIC: pacientes con dos o más procedimientos fallidos de ICSI. UA: unidades arbitrarias. Se muestran los valores individuales acompañados por la mediana.

En síntesis, la gran variabilidad observada en las cuantificaciones, como así también

los bajos porcentajes de detección hallados, exponen la necesidad de hallar un método de cuantificación más sensible, capaz de reducir la dispersión de los datos y alcanzar un índice de detección superior

Cuantificación de 5'-tiARNs en muestras de plasma seminal por ddPCR

Los resultados expuestos en el apartado anterior para la cuantificación de 5'-tiARNs seminales mediante RT-qPCR sustentan la necesidad de explorar un nuevo método para la detección de estas moléculas en plasma seminal, un fluido biológico sumamente complejo, con el propósito de disminuir el ruido experimental y aumentar los índices de detección en las muestras. Tal como se describió en la Introducción, la ddPCR expone ventajas claras con respecto a la RT-qPCR para la cuantificación de ADNc proveniente de muestras biológicas. Entre ellas pueden destacarse la capacidad de obtener una cuantificación absoluta del ADN blanco y la resiliencia a los inhibidores de la PCR. Esto la postula como una técnica capaz de superar las limitaciones de la RT-qPCR para la cuantificación de los 5'-tiARNs seminales.

Para llevar a cabo la puesta a punto de la técnica de ddPCR en la cuantificación de 5'-tiARNs seminales, se seleccionó 5'-tiARN-Gly como ADNc blanco, debido a que es uno de los 5'-tiARN más abundante

en PS. Para ello, tal como se describió en Materiales y métodos fue preciso rediseñar los cebadores para la amplificación de 5'-tiARN-Gly. Dado que estos son más pequeños que los empleados para la cuantificación de este 5'-tiARN mediante RT-qPCR, su temperatura de desnaturalización es inferior. Por consiguiente, primero se verificó a qué temperatura de hibridación (T_a) estos nuevos cebadores amplificaban un producto específico por RT-qPCR. Con dicho objetivo, se realizó un experimento de qPCR utilizando la sonda fluorescente inespecífica SYBR Green, incluyendo: a) una muestra de ADNc obtenido por retrotranscripción de 5'-tiARN-Gly sintético y; b) una muestra de ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de una muestra de PS. Se utilizó el par de cebadores diseñado para la amplificación por ddPCR, empleando distintos valores de T_a . Además, en la corrida se añadieron dos tubos adicionales con las mismas muestras, pero conteniendo los cebadores utilizados en el apartado anterior para la amplificación por qPCR de 5'-tiARN-Gly. Estos tubos se sometieron a una T_a de 60°C, la cual es la empleada en este trabajo para cuantificar este 5'-tiARN mediante RT-qPCR (Tabla II).

Con los resultados de este experimento se corroboró que, incluso a una T_a de 60°C, el par de cebadores rediseñado para los experimentos de ddPCR arrojaba

resultados comparables con los obtenidos con los cebadores usados en qPCR. Esto aseguró que la menor temperatura de desnaturalización de estos nuevos cebadores no redundaba en pérdida de astringencia en la amplificación del ADN blanco. Tal como se indicó previamente, este experimento no incluyó la sonda fluorescente específica TaqMan, necesaria para la cuantificación por ddPCR. Por este motivo, se realizó un segundo experimento de qPCR utilizando el nuevo par de cebadores y la sonda TaqMan, empleando una T_a de 60°C.

En la Tabla II se muestran los valores de C_t obtenidos en ambos experimentos. La especificidad del producto de amplificación se verificó en todos los casos mediante el análisis de las curvas de desnaturalización, que mostraron un único pico a la temperatura esperada para el amplicón del ADNc empleado.

Tabla II. Amplificación por RT-qPCR de 5'-tiARN-Gly empleando los cebadores rediseñados para ddPCR a distintas temperaturas de hibridación

<i>Sonda SYBR Green</i>					
Muestra de origen del ARN a partir del cual se sintetizó el ADNc	Cebadores para ddPCR				Cebadores para RT-qPCR
	Ta (°C)				Ta (°C)
	45	50	55	60	60
5'-tiARN-Gly sintético (Ct)	12.5	10.9	10.6	13.4	8.8
PS (Ct)	35.5	32.2	32.4	37	33.6
<i>Sonda TaqMan</i>					
	Cebadores para ddPCR				
	Ta= 60°C				
5'-tiARN-Gly sintético (Ct)	9.5				
PS (Ct)	32.7				

Luego de evaluar la eficiencia de amplificación y la especificidad del par de cebadores rediseñado para la cuantificación de 5'-tiARN-Gly, se realizó el primer experimento de ddPCR. Las condiciones del mismo se determinaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, con la asistencia técnica de la Dra. Juliana Sesma y su equipo con amplia experiencia en el empleo de esta tecnología. Se utilizó el mayor volumen de ADNc posible, que en este caso era de 8,8 uL. Dado que uno de los objetivos de este primer experimento era hallar la cantidad adecuada de ADNc a utilizar para obtener una cuantificación óptima, se emplearon tres diluciones del producto de RT de 5'-tiARN-Gly sintético (1:10³; 1:10⁵; 1:10⁷). Se empleó una Ta de 60°C, y concentraciones finales de cada cebador y sonda TaqMan de 900 y 450nM, respectivamente. La fase de amplificación por PCR constó de 40 ciclos y un tiempo de extensión de un minuto, en principio suficiente para la amplificación de un producto de 56pb como es el del ADNc en cuestión.

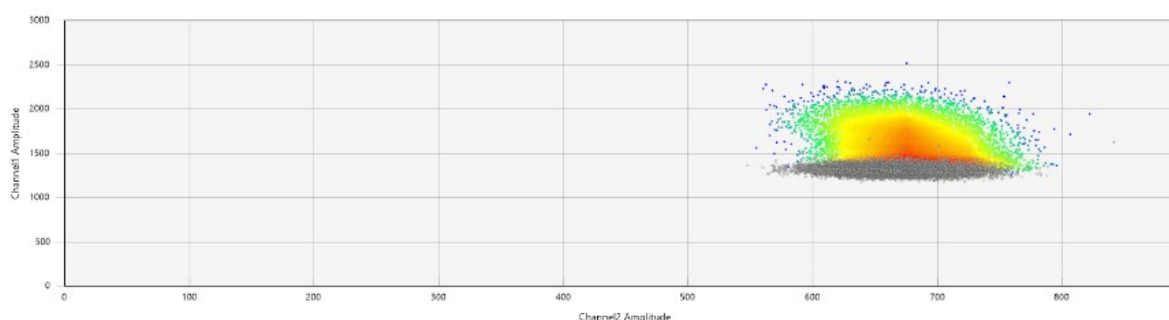


Figura 2. Cuantificación de 5'-tiARN-Gly sintético en una de las muestras utilizadas. La nube de amplificación (en color) representa las gotas positivas para 5'-tiARN-Gly, y la nube de control negativo de reacción (gris) representa las gotas negativas. El gráfico posee dos dimensiones, donde se mide la intensidad de fluorescencia del fluoróforo FAM en el eje de las ordenadas y del fluoróforo VIC en el eje de las abscisas. Dado que en todos los experimentos se utiliza una única sonda TaqMan conteniendo el fluoróforo FAM, no se observa señal fluorescente en el canal de detección de VIC.

En la Figura 2 se muestra, a modo de ejemplo, el resultado obtenido para una de las muestras, mientras que las demás arrojaron resultados similares. En ella puede observarse la nube de amplificación, conformada por puntos coloreados donde cada uno representa a una gota positiva para 5'-tiARN-Gly. Dicha nube es excesivamente grande y se encuentra superpuesta con la nube de puntos en color gris, que representa el control negativo. Esto ocurre cuando la concentración del ADN molde es muy alta, dado que muchas gotas quedan cargadas con más de una copia del ADN molde, lo que produce una señal de fluorescencia muy elevada. Esto satura la detección en el lector y conlleva, por tanto, a una subestimación del número de copias. Estos datos indican que es necesario ajustar las condiciones experimentales para lograr una cuantificación absoluta y fiable.

Mediante una búsqueda bibliográfica se identificaron algunos parámetros experimentales que pueden ser ajustados para incrementar la separación de las nubes. La disminución de la temperatura de hibridación empleada, y el aumento de la concentración de cebadores y sonda (Taylor et. al., 2015) y del número de ciclos en la fase de PCR (Lievens et. al., 2016) incrementan la eficiencia de la reacción, favoreciendo la separación de las nubes. La concentración de ADN en la muestra de partida también influye en dicha separación (Miotke et. al., 2014). De acuerdo a la información provista por el fabricante, el rango dinámico de la técnica abarca valores de concentración de entre 1 y 120.000 copias en 20 uL de reacción, siendo el sistema más eficiente cuando el número de copias es bajo, dado que el número de moléculas de ADN de partida es

muy inferior al número de gotas generadas (por ejemplo, 500 copias en 20.000 gotas). Con este marco, y en conjunto con las sugerencias del equipo de la Dra. Sesma, en los siguientes experimentos se incluyeron algunas modificaciones con respecto al primero, con el objetivo de lograr una mejor separación de las nubes y disminuir el número de copias. En la mezcla la concentración final de sonda

TaqMan y de los cebadores se incrementó a 750 nM y 1,2 uM, respectivamente, y se utilizaron 2 uL de ADNc, producto de la RT de 5'-tiARN-Gly sintético, en una dilución 1:10⁵. El volumen final de reacción se alcanzó por adición de agua miliQ. En la etapa de amplificación se realizaron 50 ciclos en lugar de 40, se aumentó el tiempo de elongación de 1 a 2 minutos, y se aplicó un gradiente de Ta, que fue de 60 a 50 °C.

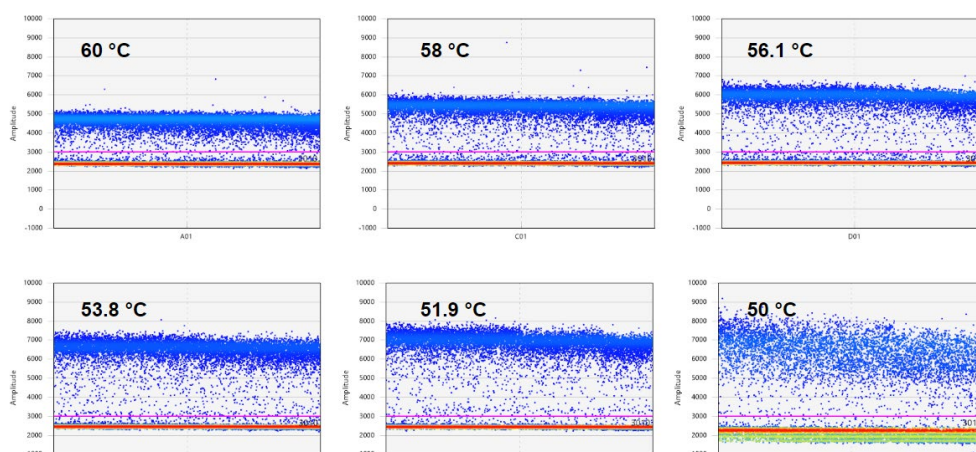


Figura 3. Cuantificación de 5'-tiARN-Gly sintético aplicando distintas temperaturas de hibridación. La línea de color magenta indica el valor de fluorescencia umbral, a partir del cual las gotas se consideran positivas para 5'-tiARN-Gly. La nube de amplificación está representada en azul, y la nube de gotas negativas se ubica por debajo de la línea umbral. Gráfico unidimensional: señal fluorescente únicamente para el fluoróforo FAM, cuya intensidad está representada en el eje de las ordenadas. En el eje de las abscisas se representa el número de gotas.

Como se observa en la Figura 3, al comparar las imágenes puede verse que la separación de las nubes se acentúa conforme disminuye Ta. Sin embargo, a 50 °C la nube de amplificación se observa difusa, lo que indica que a esta Ta la cuantificación se hace más ruidosa. El valor de Ta que mayor separación de nubes provoca sin inducir ruido experimental es aproximadamente 54 °C.

Esta es la Ta que se utilizó en todos los experimentos de ddPCR posteriores.

También se mantuvieron las demás condiciones de reacción fijadas aquí (volumen de muestra de ADNc, concentración de cebadores y sonda, tiempo de elongación, número de ciclos), debido a que todas estas modificaciones contribuyeron a la separación de las nubes.

Cabe destacar que, en este experimento, a pesar de la disminución del volumen de ADNc utilizado, el número de copias continuó por encima del valor recomendado para una cuantificación óptima, lo que nos llevó a disminuir aún más la concentración de ADNc de partida.

Optimización de la cantidad de ADNc a utilizar

Con el objetivo de aproximar la concentración de ADNc de partida a un valor semejante al sugerido por el fabricante, en conjunto con las recomendaciones del equipo técnico que opera el sistema, se decidió que el valor óptimo de concentración de la muestra de partida para la cuantificación de 5'-tiARN-Gly es 100 copias/20 uL de reacción. Para ajustarnos a este valor, se realizó un experimento en el que se incluyeron distintas diluciones del producto de RT de 5'-tiARN-Gly sintético, cuyo valor de Ct había sido determinado previamente. Los resultados de este experimento expusieron una cuantificación robusta, con separación de las nubes de gotas positivas y negativas. Esto permitió hallar una relación entre el valor de Ct obtenido por RT-qPCR y el número de copias determinado por ddPCR. En la Tabla III se muestran los resultados de este experimento.

Tabla III. Relación entre valores de Ct y número de copias/20 uL

Dilución del producto de RT de 5'-tiARN-Gly	Ct (RT-qPCR)	número de copias/20 uL (ddPCR)
10 ⁻⁶	28.5	1320
10 ⁻⁷	32	186
10 ⁻⁸	no determinado	16

Siguiendo esta vinculación entre los valores de Ct y número de copias/20 uL, se realizaron diluciones diferenciales de cada uno de los productos de RT de las muestras de ARN provenientes de PS, antes cuantificadas por qPCR, con el objetivo de que todas quedaran, en principio, por debajo del valor de 100 copias/20 uL al cuantificarlas por ddPCR. Se procedió de la siguiente forma

- Las muestras con valores de Ct menores a 31 se utilizaron en distintas diluciones, en función de sus Ct.
- Las muestras con valores de Ct iguales o mayores a 31 se utilizaron en dilución 1/20, tal como se emplean para la cuantificación por RT-qPCR.

- Las muestras que resultaron negativas por RT-qPCR se utilizaron en dilución 1/20 y 1/2000, de manera de evaluar si las muestras poseen inhibidores de la PCR que impiden la amplificación por dicha técnica, a pesar de la presencia del ADNc blanco.

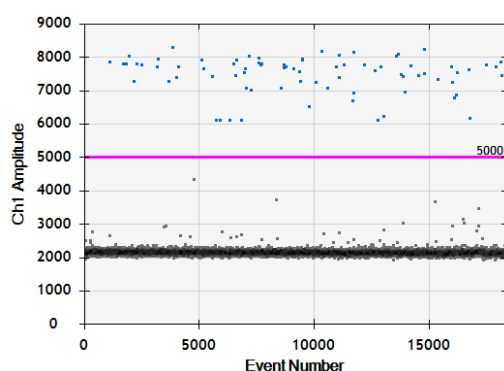


Figura 4. Cuantificación de 5'-tiARN-Gly en una de las muestras de PS. La nube de amplificación (gotas positivas) se muestran en color azul, mientras que las gotas negativas están representadas en color gris. La línea color magenta marca el valor de intensidad de fluorescencia umbral a partir del cual las gotas se consideran positivas. Gráfico unidimensional: señal fluorescente únicamente para el fluoróforo FAM, cuya intensidad está representada en el eje de las ordenadas. En el eje de las abscisas se representa el número de gotas.

En la Figura 4 se muestra, a modo de ejemplo, el resultado de una de las muestras detectadas. En ella puede observarse con claridad la separación de las nubes de gotas positivas y negativas. Asimismo, los puntos que representan a las gotas positivas están separados entre sí, lo que indica que el sistema de lectura es capaz de determinar la señal de

fluorescencia de cada una sin saturarse. La nube de gotas negativas, por su parte, se encuentra concentrada en un rango acotado de valores de intensidad de fluorescencia (eje de las ordenadas). Es por todo esto que se consideró absoluta la cuantificación de 5'-tiARN-Gly en las muestras que arrojaron resultados similares a este.

En contraste, algunas muestras resultaron imposibles de cuantificar, debido al alto grado de degradación del ARN, lo cual se manifiesta en la forma de la nube de gotas negativas, que, en lugar de verse acotada en una región del gráfico, se distribuye en el mismo formando un “chorreado”, como se ejemplifica en la Figura 5. En casos como este, es probable que las gotas con alta señal de fluorescencia sean positivas para el ADNc blanco, pero no es posible marcar una separación clara entre las nubes, por lo que la cuantificación no es precisa.

En 23 muestras restantes, los resultados mostraron un valor de número de copias/20 uL menor a 10, que fue indistinguible del ruido experimental o no fueron detectadas en absoluto. Estas muestras se incluyeron en un nuevo experimento de ddPCR, en el que se aplicó el siguiente esquema:

- Las muestras con menos de 10 copias/20 uL se utilizaron en mayor concentración, para alcanzar un valor cuantificable.

- Las muestras no detectadas que se utilizaron en una dilución 1/20 se midieron en menor concentración, para descartar la presencia de inhibidores de la PCR.
- Las muestras no detectadas que se utilizaron en una dilución mayor a 1/20 se midieron en mayor concentración, para alcanzar un valor cuantificable.

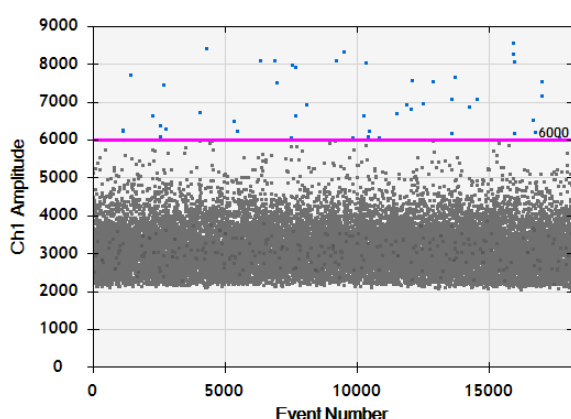


Figura 5. Cuantificación de 5'-tiARN-Gly seminal en una muestra de ARN altamente degradada. Las gotas positivas se muestran en color azul, mientras que las gotas negativas están representadas en color gris. La línea color magenta marca el valor de intensidad de fluorescencia umbral a partir del cual las gotas se consideran positivas. Gráfico unidimensional: señal fluorescente únicamente para el fluoróforo FAM, cuya intensidad está representada en el eje de las ordenadas. En el eje de las abscisas se representa el número de gotas.

En este experimento se pudieron cuantificar algunas muestras que no habían sido posibles de determinar en el primero. Sin embargo, algunas otras muestras se consideraron negativas o “no detectadas”, debido a que no se alcanzó una cuantificación fiable, ya sea por su alto

grado de degradación o porque se presume la presencia persistente de inhibidores de la PCR, algo probable considerando la alta complejidad de las muestras de PS.

El valor umbral de la intensidad de fluorescencia se fijó individualmente en cada muestra, observando la separación y el tamaño de las nubes en cada caso. En todas las muestras, el umbral se fijó entre 5000 y 7000 unidades de amplitud de fluorescencia, excluyendo así los puntos que no correspondían claramente a gotas positivas.

Cuantificación de 5'-tiARN-Gly mediante ddPCR

En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de 5'-tiARN-Gly en los grupos ICSI (+) e ICSI (-). Asimismo, este último grupo se dividió en los subgrupos 1FIC y +2FIC. Al realizar comparaciones de a pares con el grupo ICSI (+) empleando la prueba *U* de Mann-Whitney, se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de 5'-tiARN-Gly de los grupos ICSI (+) e ICSI (-), como así también entre los grupos ICSI (+) y +2FIC. Estos resultados coinciden con los datos preliminares del laboratorio.

El nivel de detección total fue de 84.7%. El grupo ICSI (+) y los subconjuntos 1FIC y +2FIC mostraron niveles de detección de 83.9%, 88% y 81.8%, respectivamente.

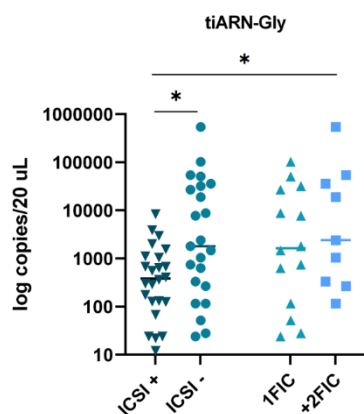


Figura 6. Niveles de 5'-tiARN-Gly en muestras de PS de pacientes normozoospermicos determinados mediante ddPCR. ICSI (+): pacientes con procedimiento exitoso de ICSI. ICSI (-): pacientes con uno o más procedimientos fallidos de ICSI. 1FIC: pacientes con un procedimiento fallido de ICSI. +2FIC: pacientes con dos o más procedimientos fallidos de ICSI. Se muestran los valores individuales acompañados por la mediana. (*) $p < 0.05$.

Comparación entre las cuantificaciones de 5'-tiARN-Gly realizadas por ddPCR y RT-qPCR

Para comparar las mediciones de 5'-tiARN-Gly seminal realizadas por ddPCR vs RT-qPCR, se calcularon los porcentajes de detección de cada una de las técnicas, mostrados en la Tabla IV. Se consideraron muestras detectadas aquellas en las que se pudo determinar la cantidad de 5'-tiARN-Gly presente, y muestras no detectadas las que no se pudieron cuantificar. Como puede observarse en la Tabla IV, ddPCR presenta un porcentaje de

detección mayor, lo que demuestra su mayor sensibilidad.

Tabla IV. Niveles de detección de 5'-tiARN-Gly seminal alcanzados por ddPCR y RT-qPCR

	ddPCR	RT-qPCR
Muestras detectadas	50	45
Muestras no detectadas	9	14
Porcentaje de detección	84.7 %	76.3 %

Finalmente, en la Figura 7 se muestran los coeficientes de variación (CV) calculados para el grupo ICSI (+) empleando tanto ddPCR y RT-qPCR. El CV es útil para comparar la variabilidad de diferentes conjuntos de datos, generados, en este caso, mediante dos técnicas distintas. Para su cálculo se emplearon los valores obtenidos para el grupo ICSI (+), ya que se puede considerar que las muestras pertenecientes a los pacientes de este grupo son más homogéneas entre sí. Si bien el valor de CV es alto para ambas técnicas, debido a la gran variabilidad y complejidad inherentes a las muestras biológicas, la determinación por RT-qPCR muestra un CV de aproximadamente el doble que la cuantificación por ddPCR.

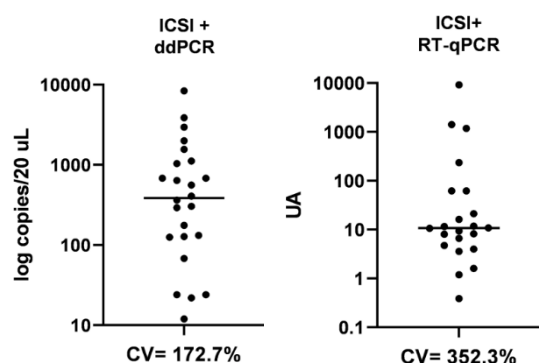


Figura 7. Coeficientes de variación (CV) del grupo ICSI (+) calculados sobre la cuantificación de 5'-tiARN-Gly mediante ddPCR (izquierda) y RT-qPCR (derecha). Se muestran los valores individuales acompañados por la mediana. UA: unidades arbitrarias.

En suma, estos resultados demuestran que la ddPCR posee mayor sensibilidad y robustez en la determinación de 5'-tiARN-Gly en muestras de plasma seminal, lo que se refleja en su incrementado porcentaje de detección y su reducido CV con respecto a la RT-qPCR.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Determinar las causas subyacentes de la infertilidad masculina inexplicada (UMI) continúa siendo un desafío para la medicina reproductiva. En nuestro laboratorio se desarrolló una línea de investigación tendiente a explorar la utilidad de los 5'-tiARNs seminales como biomarcadores de calidad espermática en individuos normozoospermicos, con el potencial de identificar a pacientes con UMI. En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis comparativo de distintas

técnicas para la cuantificación de ARN en muestras biológicas: RT-qPCR y ddPCR. La RT-qPCR, si bien constituye el *gold standard* para la cuantificación de ADNc proveniente de muestras biológicas, posee una limitada sensibilidad y es susceptible a los inhibidores de la PCR. Alternativamente, la ddPCR promete alta sensibilidad, ofreciendo una cuantificación absoluta de la molécula diana, muy resistente a la presencia de inhibidores de la PCR. Además, posee un límite de detección mucho más bajo que la qPCR, lo que permite la cuantificación de moléculas con baja abundancia (Baettig et al., 2023). Los resultados arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo ICSI (+) y el grupo ICSI (-), y entre el grupo ICSI (+) y el subgrupo +2FIC. Además, algunas muestras en las que no había sido posible cuantificar 5'-tiARN-Gly por RT-qPCR pudieron ser medidas mediante ddPCR, aumentando la detección en un 8,4% (de 76.3% para RT-qPCR a 84.7% para ddPCR). Además, esta última mostró una disminución del 179% en el coeficiente de variación del grupo ICSI (+) con respecto a la RT-qPCR. En suma, el aumento de sensibilidad y del número de muestras detectadas permitió alcanzar mayor robustez en la determinación y obtener resultados coincidentes con los preliminares del laboratorio, lo que sugiere que la ddPCR constituye una técnica superadora a la RT-

qPCR en la cuantificación de 5'-tiARNs en muestras de plasma seminal.

A la hora de pensar en la aplicabilidad de una técnica en el campo clínico, no pueden excluirse algunos puntos clave, como ser el costo, la complejidad y el tiempo que demanda la obtención de resultados. Mientras que la qPCR solo utiliza un equipo de PCR en tiempo real (y un termociclador en caso de tener que realizar la retrotranscripción de las muestras), la ddPCR requiere tres equipos, uno para cada una de sus etapas: un generador de gotas, un termociclador y un lector de fluorescencia de las gotas. Esto aumenta invariablemente los costos y la complejidad del ensayo.

Por otro lado, mientras que la cuantificación por qPCR lleva, por lo general, entre dos y tres horas de acuerdo al diseño experimental, la ddPCR requiere como mínimo el mismo tiempo solo para incubar las muestras entre el paso de amplificación y de lectura, y a esto se suma el tiempo demandado para la generación de las gotas, la amplificación por PCR y la lectura de la señal fluorescente. Si además consideramos que, de acuerdo a los resultados presentados aquí, solo se incrementó el nivel de detección un 8%, el reemplazo de la RT-qPCR por la ddPCR no se proyecta como una alternativa superadora en el ámbito clínico.

BIBLIOGRAFIA

- Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., et al. (2014). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertility and Sterility*, 101(1), 78-86.e2.
- Baettig, C. G., Zirngibl, M., Smith, K. F., Lear, G., & Tremblay, L. A. (2023). Comparison between droplet digital PCR and reverse transcription-quantitative PCR methods to measure ecotoxicology biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 190, 114829.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), 179.
- Grosso, J. B., Zoff, L., Calvo, K. L., Maraval, M. B., Perez, M., Carbonaro, M., Spinelli, S. V. (2021). Levels of seminal tRNA-derived fragments from normozoospermic men correlate with the success rate of ART. *Molecular Human Reproduction*, 27(4).
- Gül, M., Russo, G. I., Kandil, H., Boitrelle, F., Saleh, R., Chung, E., Kavoussi, P., Mostafa, T., Shah, R., & Agarwal, A. (2024). Male Infertility: New Developments, Current Challenges, and Future Directions.

- World Journal of Men's Health. Advance online publication. <https://doi.org/10.5534/wjmh.23023>
- 2
- Hamada, A., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2011). Unexplained male infertility: Potential causes and management. *Human Andrology*, 1, 2-16.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604-8610.
- Kovac, J. R., Pastuszak, A. W., & Lamb, D. J. (2013). The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertility and Sterility*, 99(4), 998-1007.
- Lievens, A., Jacchia, S., Kagkli, D., Savini, C., & Querci, M. (2016). Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization. *PLoS One*, 11(5), e0153317.
- Wildenberger, K., Niederwieser, D., & Franke, G. N. (2019). Optimized Digital Droplet PCR for BCR-ABL. *Journal of Molecular Diagnostics*, 21(1), 27-37.
- Miotke, L., Lau, B. T., Rumma, R. T., & Ji, H. P. (2014). High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Analytical Chemistry*, 86(5), 2618-2624.
- Taylor, S. C., Carbonneau, J., Shelton, D. N., & Boivin, G. (2015). Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *Journal of Virological Methods*, 224, 58-66.
- Te, S. H., Chen, E. Y., & Gin, K. Y. (2015). Comparison of Quantitative PCR and Droplet Digital PCR Multiplex Assays for Two Genera of Bloom-Forming Cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5203-5211.
- WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Fifth Edition. 5a. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research; 2010.

39.- Salud humana

Apalutamida modula la viabilidad y la migración a través de los genes diana del AR y NOTCH

Autor: Herrera, Sofía Belén¹, sbherrera@comunidad.unnoba.edu.ar

Co-autor(es): Chimento, Agustina^{1,2}, agustinachimento13@gmail.com; Parenti Fernanda⁴ (mfparenti@yahoo.com.ar).

Orientador/a: Cristina, Carolina^{1,3}, carolina.cristina@nexo.unnoba.edu.ar

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA). ¹Laboratorio de Neuroendocrinología/Fisiopatología de la Hipófisis; Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CIBA) – Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, Junín, Buenos Aires, Argentina. ²Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, CIC, La Plata, Buenos Aires, Argentina. ³Centro de Investigaciones y Transferencia CIT NOBA, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (UNNOBA-UNSA-CONICET). ⁴Centro Médico Faml, Junín, Provincia de Buenos Aires.

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es el tumor más frecuente en hombres y su progresión está regulada en gran parte por la señalización del receptor de andrógenos (AR). La resistencia a terapias hormonales, como la Apalutamida, representa un desafío clínico. En este contexto, nos propusimos estudiar la interacción de la vía Notch con la señalización del AR; evaluando si la inhibición de Notch con DAPT potencia el efecto antiandrogénico de Apalutamida en células LNCaP, modelo sensible a andrógenos.

La viabilidad celular, evaluada por cristal violeta, mostró una reducción significativa con 0,5 y 2,5 μM de Apalutamida a las 72 h de iniciado el tratamiento. Por otro lado, en ensayos de migración por cierre de la herida, Apalutamida redujo la capacidad migratoria de las células LNCaP. Se evaluó la expresión génica de *PSA* y *TMPRSS2* (genes diana del AR), y *HES1* y *HEY2* (genes diana de Notch) por RT-qPCR tras tratamiento con distintas concentraciones de Apalutamida (0,05–75 μM , 48 hs). Apalutamida redujo la expresión de *PSA* y *TMPRSS2* en forma dosis-dependiente. Además, redujo *HES1* y *HEY2*, lo que sugiere una posible interacción entre ambas vías de señalización.

Se necesitarán ensayos futuros para evaluar si el tratamiento combinado con DAPT acentúa el efecto de Apalutamida sobre estos y otros parámetros de interés clínico.

En conjunto, nuestros resultados indican que Apalutamida impacta sobre la viabilidad, migración y expresión de genes diana del AR y Notch, apoyando el estudio de estrategias

terapéuticas combinadas en el CaP.

Palabras clave: Cáncer de próstata, receptor de andrógenos, señalización Notch.

Introducción

La próstata es un órgano fibromuscular y glandular localizado en la cavidad pélvica, detrás del pubis, delante del recto y debajo de la vejiga. Rodea el primer segmento de la uretra justo por debajo del cuello vesical. Tiene forma de pirámide invertida. Aunque el tamaño de la próstata varía con la edad, en hombres jóvenes y sanos, la glándula normal tiene el tamaño de una “nuez”. La próstata constituye parte del sistema urinario y reproductor, relacionándose anatómicamente con otras estructuras como los conductos deferentes y las vesículas seminales (Rodríguez, 2019). Su función es la de producir el fluido prostático que, en combinación con el espermatozoides proveniente de los testículos, componen el semen (Rita, 2023).

En la práctica clínica, la próstata se divide en una zona central, zona periférica, zona transicional y estroma fibromuscular anterior. La zona periférica es la más extensa. Se expande desde la cara posterior de la próstata, envolviendo la uretra posterior. La zona central se encuentra en la base de la próstata, envolviendo los conductos eyaculadores. La zona transicional es corta y rodea la porción proximal de la uretra prostática superior al colículo seminal. El colículo

seminal es un punto de unión entre el conducto eyaculador y la uretra. El estroma fibromuscular anterior corresponde al istmo prostático (Rita, 2023).

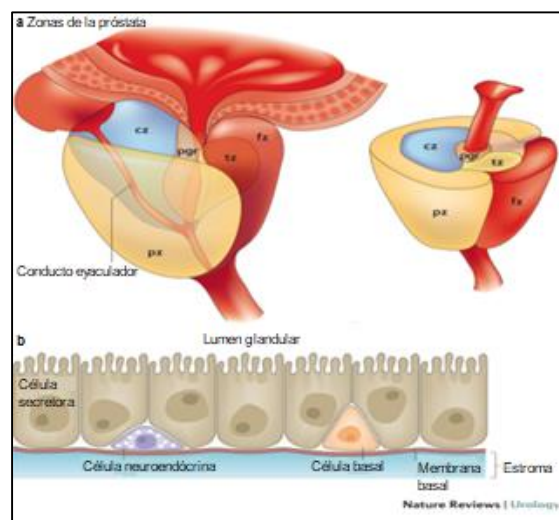


Figura 1. Esquema de las diferentes zonas de la próstata. Se pueden observar las células secretoras y los lúmenes. En la base, se encuentran las células neuroendocrinas y las células basales. La membrana basal separa estas células del estroma. La membrana basal está compuesta de matriz extracelular. Esta membrana es importante no solo para la estructura, sino también por su papel en el desarrollo de la glándula y el control de las funciones celulares. Adaptado de (Ryan P. Terlecki, 2018).

Del 60 al 70% de los carcinomas de próstata se originan en la zona periférica,

10 a 20% afectan a la zona de transición, y 5 a 10% a la zona central (Rodríguez, 2019).

El componente epitelial está formado por los conductos y acinos prostáticos, que producen secreción prostática y están inmersos en el estroma prostático. El estroma es tejido conectivo laxo, compuesto principalmente por fibroblastos y miofibroblastos, que sostienen y nutren el epitelio secretor de la glándula; por lo que es esencial para su desarrollo. El estroma y el epitelio intercambian factores paracrinós bajo la acción androgénica, lo cual es necesario para la morfogénesis prostática. Más del 99% de los tumores de próstata son de origen epitelial, y los tumores derivados del tejido conectivo constituyen una pequeña minoría de los casos (Sanches, 2021).

El desarrollo de la próstata se produce mediante interacciones mesenquimalepiteliales orquestadas, bajo la influencia de hormonas esteroides, entre el epitelio y los mesénquimas del seno urogenital. La testosterona y, poco después, el estradiol actúan conjuntamente para estimular estas interacciones. La acción de la testosterona en el compartimento estromal es esencial para la formación de la próstata, ya que la inhibición del Receptor de Andrógenos (AR) mesenquimal impide la formación de la glándula (Sanches, 2021).

El mantenimiento de los niveles hormonales es fundamental para la fisiología normal de la próstata, ya que incluso pequeñas variaciones pueden implicar problemas funcionales y patologías. En este sentido, las células del estroma desempeñan un papel importante en la dinámica hormonal de la glándula. Reciben hormonas endocrinas del torrente sanguíneo y las distribuyen al epitelio en un proceso de gran complejidad (Sanches, 2021).

Como se mencionó anteriormente, la función de la próstata es la producción del fluido prostático, el cual contiene proteínas secretoras, enzimas, factores de crecimiento, citrato y zinc. Todas estas son moléculas necesarias para mantener la viabilidad, activación y nutrición de las células espermáticas. Una de las proteínas secretadas en el fluido prostático es el antígeno prostático específico (PSA), un marcador clínico cuyo valor aumenta usualmente ante la presencia de inflamación o cáncer prostático (Ryan P. Terlecki, 2018).

El receptor de andrógenos (AR) es un receptor de esteroides, que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, desempeña un papel fundamental en el cáncer de próstata (PCa) (Li, 2024). Es una proteína de 919 aminoácidos (110 kDa) que contiene un dominio N-terminal (NTD), un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio C-terminal de unión al ligando

(LBD). La forma inactiva del AR reside principalmente en el citoplasma, donde es estabilizada por proteínas chaperonas. Cuando es activado por andrógenos, más comúnmente testosterona o DHT, el AR sufre una modificación alostérica, se homodimeriza y luego se transloca al núcleo donde se une al ADN en los sitios de unión del AR (ARBS). Una vez unido a elementos cis -reguladores potenciadores (CRE), el AR recluta corre reguladores, complejos de remodelación y otros TF para crear un centro transcripcional que inicia un programa transcripcional dependiente de AR, que impacta la expresión de varios cientos de genes diana (Özturan, 2022). En síntesis, el AR es un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que regula la expresión de genes diana, como el PSA y TMPRSS2, mediante elementos de respuesta hormonal (ERH) (Li, 2024).

La proteasa transmembrana serina 2 (TMPRSS2) pertenece a la familia de las serina proteasas transmembrana tipo II (TTSP). La expresión abundante de TMPRSS2 es evidente en el tejido prostático normal; sin embargo, su papel biológico exacto aún no está claro. TMPRSS2 está desregulado en varios tipos de neoplasias malignas, incluyendo carcinomas de mama, pulmón, gástrico, ovario y renal (Gioukaki, 2023). Por otro lado, el antígeno prostático específico (PSA) es actualmente el indicador más comúnmente usado para el diagnóstico de

CaP. Los niveles elevados de PSA significan alteraciones en la estructura de la glándula prostática, lo que aumenta notablemente el riesgo de CaP. Sin embargo, los niveles elevados de PSA no indican inequívocamente CaP, ya que la hiperplasia prostática benigna (HPB) y/o la enfermedad inflamatoria de la próstata pueden elevar los niveles de PSA. Dadas estas complejidades, sigue existiendo una necesidad apremiante de más investigación sobre el tratamiento y diagnóstico de CaP. Particularmente crucial es una investigación en profundidad sobre el mecanismo molecular de CaP, allanando el camino para estrategias terapéuticas más efectivas (Li, 2024).

La desregulación de la vía de señalización clásica de AR es la principal responsable del desarrollo, crecimiento y progresión de los tumores de próstata. Los compartimentos epiteliales y estromales de la próstata sana expresan AR. En las células cancerosas de la próstata, la señalización regular del AR se interrumpe y se produce la señalización proliferativa del AR (Wilson, 2024).

Debido a la fuerte asociación del cáncer de próstata con la señalización de AR, se desarrollaron terapias de privación de andrógenos (ADT) para ayudar a frenar el crecimiento y desarrollo de la enfermedad (Wilson, 2024). Es por ello que surgen los anti andrógenos, como la Apalutamida.

Apalutamida es un antagonista no esteroideo y competitivo del AR, dirigido al LBD. Su forma de acción es la siguiente: inhibe de forma competitiva y reversible la unión de testosterona y DHT al dominio de unión del ligando del AR y también produce la inhibición posterior de la translocación del receptor al núcleo desde el citoplasma, el reclutamiento de coactivadores, la unión al ADN y la transcripción de genes diana del AR (Desai, 2021).

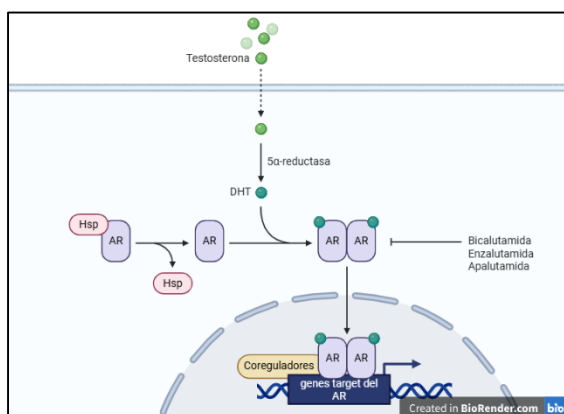


Figura 2. Vía de señalización del AR y su inhibición mediante los anti andrógenos de uso clínico. Creado en <https://BioRender.com>.

Sin embargo, la resistencia a estas terapias es inevitable y causa graves problemas con respecto al tratamiento. Tres mecanismos principales conducen a la resistencia a ADT, siendo el más común la reactivación de la vía de señalización de AR a pesar de estar presentes niveles deficientes de andrógenos, lo que puede ocurrir a través de la sobreexpresión de la proteína AR o la amplificación del gen AR. Los otros dos mecanismos de resistencia a ADT incluyen

el mecanismo de derivación, que permite que las vías dependientes de AR se activen independientemente de la activación de AR (Wilson, 2024), como las mutaciones en el LBD que resultan en la activación del AR no solo por andrógenos, sino también por esteroides no androgénicos y antiandrógenos (Li, 2024). Esta resistencia a ADT es lo que conduce a que las formas regulares de cáncer progresen a la forma más agresiva, conocida como Cáncer de Próstata Resistente a la Castración (CRPC) (Wilson, 2024).

En este contexto, los mecanismos de resistencia involucran la proliferación y formación de colonias capaces de metástasis a través de varias vías de señalización, incluyendo NF- κ B, PI3K/AKT, Wnt, TGF- β y Notch (Goncharov, 2025). Algunas de las vías llevan señales externas del entorno o células vecinas, otras desencadenan los programas internos de muerte celular y proliferación (Orzechowska, 2022).

La vía de señalización Notch está implicada en la auto-renovación de células madre, la determinación del destino celular de células progenitoras y la diferenciación terminal de células proliferantes (Goncharov, Signalling pathways in a nutshell: from pathogenesis to therapeutical implications in prostate cancer, 2025), con el fin de determinar la arquitectura tisular (Orzechowska, 2022).

La señalización canónica de Notch se inicia mediante la interacción entre un ligando de Notch y un receptor transmembrana de Notch en la superficie de una célula vecina. En mamíferos, la vía Notch consta de cuatro receptores equivalentes (NOTCH1-NOTCH4) y cinco ligandos, incluyendo tres proteínas tipo Delta (DLL-1, 2 y 4) y dos proteínas Jagged (Jagged-1 y Jagged-2). Tras la unión del ligando a los receptores Notch en la superficie celular, comienza un proceso de escisión por proteólisis en dos pasos. La primera escisión es catalizada por las metaloproteasas de la familia ADAM y conduce a la eliminación del dominio extracelular de Notch, que posteriormente se destina a la degradación lisosomal. La parte residual de la proteína Notch, denominada Notch extracelular truncado (NEXT), sufre una segunda escisión mediada por la γ -secretasa. Esto provoca la liberación del dominio intracelular (NICD) del dominio transmembrana (TM). El NICD se transloca al núcleo y activa la transcripción de los genes diana de Notch formando un complejo activador con la proteína de unión al ADN (CSL) y un miembro de la familia de coactivadores transcripcionales tipo mastermin (MAML). Las dianas de Notch mejor caracterizadas son miembros de las familias de genes HES y HEY, que regulan aspectos de la expresión de genes implicados en la determinación del destino celular dependiente de Notch, como la apoptosis,

la proliferación o la diferenciación. Hay estudios que han implicado la vía Notch en la regulación de la morfogénesis de la próstata, y se ha encontrado la expresión de miembros específicos de la señalización Notch en células epiteliales. Específicamente, NOTCH1 se expresa en las capas basal y luminal, mientras que JAG1 y DLK1 se restringen a las células lumbinales y basales, respectivamente. Además, se ha demostrado que HEY1, junto con el AR, se expresa en células epiteliales lumbinales, y que HEY1 actúa como corepresor del AR (Anusewicz, 2021).

Se ha recopilado evidencia sobre las consecuencias cancerígenas de la desregulación de Notch, incluso en PCa. Se ha evidenciado un rol ambiguo de dicha señal, siendo oncogénica en varios tumores humanos como leucemia linfoblástica aguda, meduloblastoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y de mama; y, por otro lado, con un papel antioncogénico en carcinomas cutáneos de células escamosas y basocelulares y en carcinoma de cérvix uterino. En cuanto al PCa, no se ha identificado un papel claro para la vía de señalización Notch (Goncharov, Signalling pathways in a nutshell: from pathogenesis to therapeutical implications in prostate cancer, 2025). En este sentido, es de especial interés en este trabajo, analizar la

interacción y modulación tanto de la vía de señalización Notch como del AR en líneas celulares de PCa.

La proliferación y renovación de células madre cancerosas son fundamentales para la progresión de la enfermedad y son promovidas por la expresión del ligando Notch en células nicho (en glioblastoma humano, cáncer de mama y cáncer colorrectal) y, en general, por la señalización de la vía intracelular desregulada. La activación de Notch promueve la transición epitelial a mesenquimal (EMT), que luego facilita la invasión de la enfermedad y la propagación metastásica. Además, la señalización yuxtacrina y paracrina de Notch ayuda a dar forma al microambiente tumoral (TME). A través de estos procesos, la vía Notch puede instigar la resistencia del cáncer a las estrategias terapéuticas tradicionales, lo que la convierte en un objetivo oncológico crítico. Inhibir la vía Notch con inhibidores de la gamma-secretasa (GSI) ha reducido la progresión tumoral en la leucemia linfocítica aguda de células T, cáncer de pulmón de células no pequeñas y en cáncer de próstata (McCaw, 2020). La eficacia anticancerígena de los GSI en modelos preclínicos es prometedora, se cree que los GSI pueden impulsar la diferenciación de células tumorales y la apoptosis a través de múltiples mecanismos, reducir la carga de células madre cancerosas y también obstaculizar

la EMT y superar la resistencia a las terapias convencionales (Song, 2023).

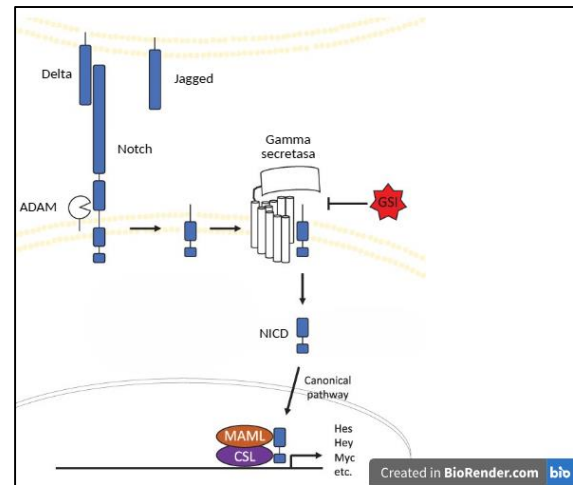


Figura 3. Esquema de la vía de señalización Notch y el uso de GSI. GSI, inhibidor de la gamma secretasa; MAML, familia similar a Mastermind; NICD, dominio intracelular de Notch. Adaptado y modificado de (McCaw, 2020).

Objetivos:

Evaluar el efecto del antiandrógeno Apalutamida sobre la expresión génica, viabilidad y migración en células de cáncer de próstata LNCaP, y explorar la posible interacción entre la señal del AR con la vía de los receptores Notch.

Materiales y métodos:

Líneas celulares: Se utilizó la línea celular metastásica de cáncer de próstata LNCaP. Las células LNCaP derivan de una metástasis en los ganglios linfáticos. Estas células son AR positivas, lo que significa que expresan el receptor de andrógenos y responden al estímulo con andrógenos.

Drogas: Para el tratamiento de la línea celular se utilizaron 1) el inhibidor de la γ -secretasa DAPT (Santa Cruz Biotechnology), que actúa como inhibidor de la activación de Notch, en las dosis de 10 y 30 μ M; 2) el antagonista del receptor de andrógenos, Apalutamida (Gador) en la dosis 0.5, 1, 2.5 y 50 μ M; y 3) el agonista del AR Propionato de Testosterona (Parafarm) en la dosis 10^{-8} M. Las drogas se disolvieron en DMSO, para el caso del DAPT y Apalutamida; y en etanol absoluto, para el caso de la Testosterona, y se almacenaron a -20°C . Para su uso en los tratamientos en cultivo se diluyeron en medio de estímulo; los mismos se realizaron durante 24, 48 o 72 hs, según corresponda.

Cultivo celular: La línea celular de cáncer de próstata LNCaP fue cultivada en adherencia en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Se mantuvo en estufa a 37°C y atmósfera controlada de 5% de dióxido de carbono. Para la realización de los experimentos, las células fueron plaqueadas en medio completo y se dejaron adherir a la placa por 24 horas. Pasado ese tiempo, el medio completo de cada pocillo fue reemplazado por medio de estímulo fresco, compuesto por RPMI suplementado con 5% de suero fetal

bovino (SFB), 1% de glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Una vez agregado el medio de estímulo, las células fueron llevadas nuevamente a la estufa durante una hora para su estabilización y posteriormente se realizaron los tratamientos correspondientes. La cantidad inicial de células y el tiempo de incubación con el estímulo dependió del tipo de experimento y se detalla a continuación:

Experimento	Cantidad inicial de células (placa utilizada)	Tiempo de estímulo
Expresión génica (RT-qPCR)	125.000 (p12)	48 horas
Ensayo de viabilidad celular	5000 (p96)	24, 48 y 72 horas
Ensayo de migración	150.000 (p12)	24 horas

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR): Los experimentos de ARN realizados a partir de lisados celulares se procesaron mediante el método de Trizol para extracción del ARN total. El ARN fue cuantificado y convertido a ADN copia por retrotranscripción (RT) y la RT-qPCR se realizó según protocolo utilizado en nuestro laboratorio (Cristina et al., 2005).

Ensayo de viabilidad celular: La viabilidad de las células tumorales LNCaP bajo los tratamientos mencionados anteriormente se determinó mediante la tinción con Cristal Violeta. Para ello, se removió el medio de cultivo y se agregó PFA 2% por 20 minutos. Luego se realizaron dos lavados con PBS y se colocó Cristal Violeta 0,5% por 20 minutos. Se descartó el colorante y se realizaron tres lavados con PBS. Se dejó secar a temperatura ambiente por 1 h y 30 min. Se agregó metanol y se dejó en agitación por 20 min. Se midió la absorbancia a 595nm en un lector de microplacas de ELISA (BioRad).

Ensayo de migración: la capacidad migratoria de las células tumorales LNCaP bajo los tratamientos mencionados anteriormente se determinó mediante el ensayo de cierre de herida. Las líneas celulares se cultivaron en las cantidades especificadas en la sección de cultivo correspondiente. Una vez alcanzada una confluencia del 90%, el medio completo se removió y se las incubó con su medio correspondiente desprovisto de suero por aproximadamente 16 horas. La privación de suero tiene como objetivo sincronizar al cultivo celular en fase G0 para evitar la proliferación celular durante el experimento. Una vez finalizado este paso, se eliminó el medio de cultivo y se realizaron las heridas en la monocapa utilizando una punta de pipeta estéril de 10

μl. Se removieron las células sueltas mediante dos lavados con solución fisiológica tibia y se adicionaron los estímulos correspondientes. Se tomaron fotos en la misma posición a las 0, 4, 8 y 24 hs con una cámara acoplada a microscopio invertido. El área libre de migración se cuantificó por selección manual con Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

GeneMANIA: (<http://www.genemania.org>) es una herramienta analítica en línea que proporciona información sobre interacciones proteicas y genéticas, análisis de enriquecimiento y coexpresión génica, y predicción de la función de genes de interés (Qing, 2022). Se seleccionó *Homo sapiens* como especie objetivo en la página principal de GeneMANIA ingresando las listas de genes objetivo a analizar (de las vías AR y Notch).

Análisis estadístico: En todos los casos, se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de variancias. En los experimentos donde se compararon dos medias, se determinó el grado de significancia con el test de Student (test paramétrico) o test de Kruskal Wallis (test no paramétrico). Para los experimentos que involucraron el análisis de dos variables, se realizó two-way ANOVA y post-test de Bonferroni. Los resultados se expresaron como media $\pm$ error estándar

(E.E) y un $p < 0.05$ se consideró significativo.

Resultados y discusión:

Con el fin de escoger una dosis efectiva de inhibición de la vía de señalización del AR, en primer lugar, realizamos una curva dosis/respuesta con el antiandrógeno Apalutamida y evaluamos la viabilidad celular

Si bien no se observan diferencias significativas ($p = 0,0768$) entre las distintas condiciones de tratamiento con Apalutamida respecto al control en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 4); se observa una caída entre un 20 - 40% luego de 72 hs de tratamiento en todas las dosis estudiadas.

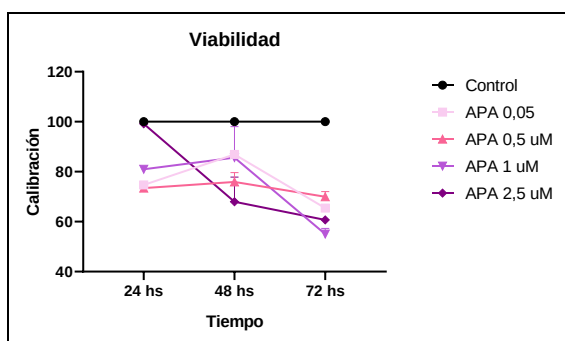


Figura 4. Efecto del tratamiento con Apalutamida (APA) sobre la viabilidad de las células LNCaP.

En cuanto al ensayo de expresión génica por RT-qPCR, se puede observar que Apalutamida tiene el efecto inhibitorio deseado en un rango amplio de dosis que va desde los 0,5 a los 50 μM determinado

a través de la expresión de los genes diana del AR (*PSA* y *TMPRSS2*) (Figura 5). Además, se puede observar que la expresión de *TMPRSS2* aumenta con dosis altas del antiandrógeno, pudiendo haber una reexpresión génica o mecanismos de feedback donde células que sobreviven al tratamiento aumentan la expresión para compensar.

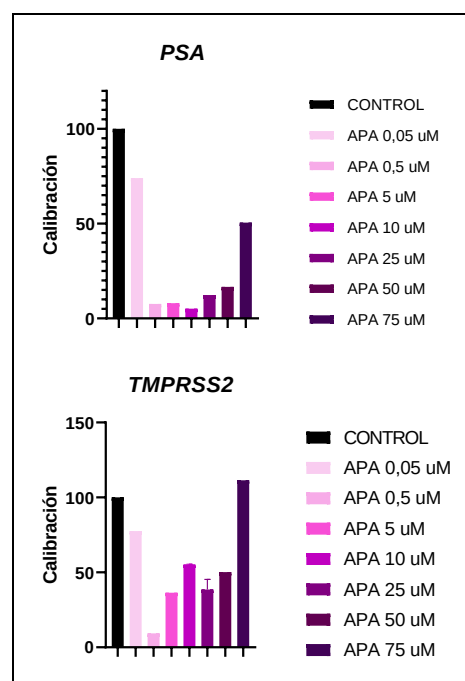


Figura 5. Expresión génica evaluada mediante RT-PCR de *PSA* y *TMPRSS2*, relativizada al gen de expresión constitutiva *G3PDH*.

La actividad enzimática de *TMPRSS2* se ha implicado en la invasión del cáncer. Ko et al. realizaron estudios in vitro en tres líneas celulares diferentes de cáncer de próstata: NCaP, PC3 y DU145. La sobreexpresión de *TMPRSS2* en estas tres líneas celulares no tuvo efecto en el

crecimiento celular, pero se asoció significativamente con una mayor invasividad. Otro estudio utilizó el modelo de adenocarcinoma transgénico de próstata de ratón (TRAMP) y encontró que la expresión de TMPRSS2 correlacionaba con una mayor frecuencia de metástasis macroscópica. Además, el estudio sugirió que TMPRSS2 desempeña un papel crítico en la activación enzimática del factor de crecimiento hepático (HGF), que, a su vez, promueve la señalización de la tirosina quinasa del receptor c-MET, lo que conduce a la mejora de un fenotipo de transición epitelial a mesenquimal pro-invasivo. Por último, en un estudio realizado por Wilson et al., se encontró que TMPRSS2 podía activar catalíticamente PAR-2 en líneas celulares de cáncer de próstata, lo que conduce a una mayor expresión de las metaloproteinasas de matriz 2 y 9. Se sabe que estas dos moléculas degradan la matriz extracelular, promoviendo la metástasis del cáncer. Otro aspecto importante del papel patogénico de TMPRSS2 en el cáncer es su participación en reordenamientos cromosómicos. Se identificó un reordenamiento cromosómico recurrente entre el gen TMPRSS2 y dos miembros de la familia de factores de transcripción específicos de transformación (ETS) E26, a saber, el gen relacionado con ETS (ERG) y el factor de transcripción variante 1 de ETS (ETV1). Además, se ha descubierto

que estas moléculas se sobre expresan en el cáncer de próstata (Gioukaki, 2023). En conjunto, estos hallazgos podrían reafirmar aún más la diferencia en la expresión de *PSA* y *TMPRSS2* bajo el tratamiento con Apalutamida; pudiendo existir otro tipo de interacciones, como podría ser entre *TMPRSS2* y algún componente de la vía Notch.

En este sentido, para empezar a evaluar la interacción de la señal del AR con la vía Notch se determinó la expresión de genes diana de la vía Notch (*HES1* y *HEY2*) bajo tratamiento con Apalutamida. No se observaron diferencias significativas en la expresión de ambos genes respecto al control, mostrando una respuesta variable no dependiente de la dosis de tratamiento (Figura 6). Aunque los cambios no alcanzaron significancia estadística, los resultados sugieren que la modulación del AR mediante Apalutamida puede impactar en la expresión de genes diana de la vía Notch. Este hallazgo resulta de interés dado que, en estudios previos, se postuló que la familia de genes *HEY* funciona como correpresores del AR (Lavery, 2011); reforzando la hipótesis de una posible interacción entre ambas vías de señalización.

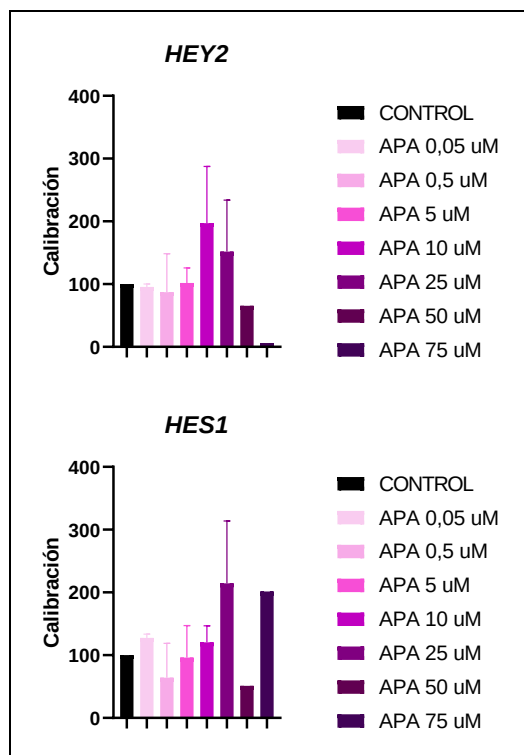


Figura 6. Expresión génica evaluada mediante RT-PCR de *HES1* y *HEY2*, relativizada al gen de expresión constitutiva *G3PDH*.

Ahondando en el estudio de la posible interacción entre ambas vías de señalización, mediante un análisis bioinformático se obtuvo una red de interacción proteica y genética (Figura 7). En esta red se puede confirmar la interacción entre el AR y *HEY1*. Además, se visualiza una interacción genética entre *TMPRSS2* y *DLL1*, el ligando de la vía Notch.

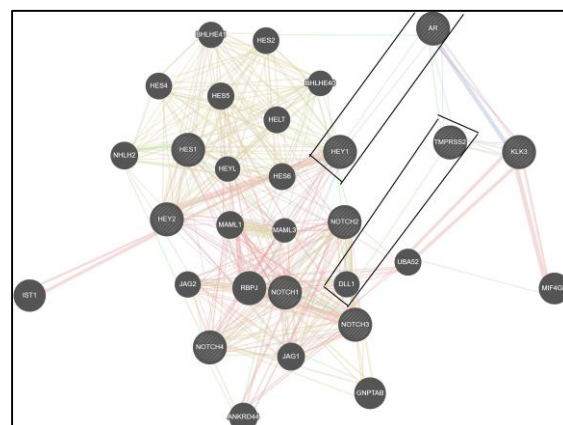


Figura 7. Red de interacción proteica y genética de componentes de las vías AR y Notch. Obtenido mediante GeneMANIA.

Por último, en cuanto a los ensayos de migración si bien no alcanzaron significancia estadística entre las distintas condiciones de tratamiento respecto al control en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 8); se puede visualizar que las dosis de 0,05 y 2,5 μ M tienden a aumentar el área libre de migración respecto al control.

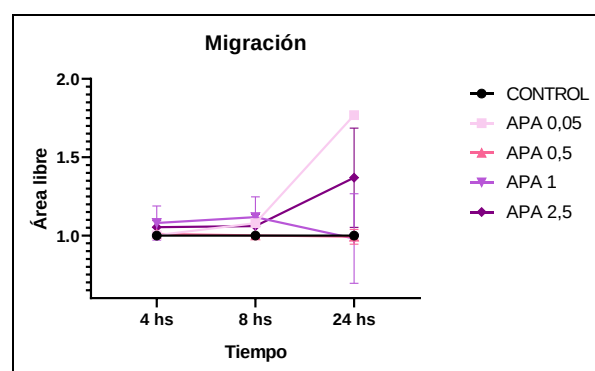


Figura 8. Efecto del tratamiento con Apalutamida sobre la migración de células LNCaP, evaluado como área libre de migración.

En conjunto, estos resultados indicarían que la inhibición de la vía del AR con Apalutamida tiene efectos tanto funcionales como moleculares reflejándose en la disminución de viabilidad y migración, aunque sin alcanzar significancia estadística en estos ensayos. Los resultados sugieren que la modulación molecular antecede a cambios fenotípicos detectables. En este sentido, realizamos ensayos preliminares con el tratamiento combinado de Apalutamida y DAPT. En cuanto a la migración, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 9). Sin embargo, los tratamientos combinados aumentan el área libre de migración respecto a los aislados.

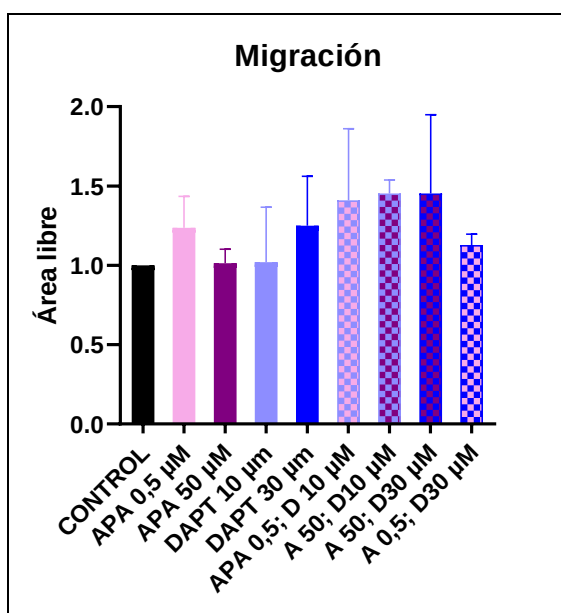


Figura 9. Efecto del tratamiento con Apalutamida y DAPT sobre la migración de células LNCaP, evaluado como área libre de migración.

Por último, el ensayo de viabilidad demuestra que disminuye la viabilidad celular respecto al control cuando se trata a las células de forma combinada con las dosis de 0,5 µM de Apalutamida y 10 µM de DAPT (Figura 10).

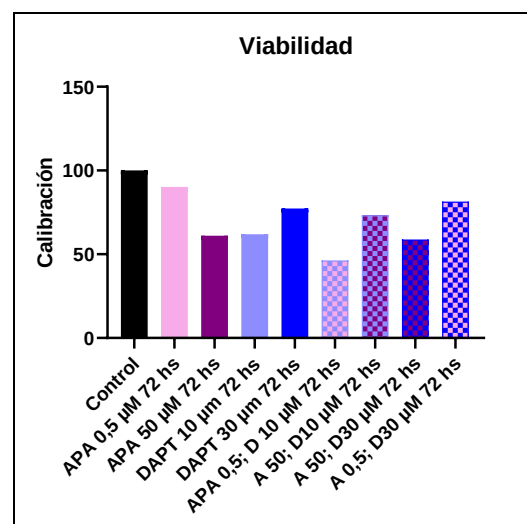


Figura 10. Efecto del tratamiento con Apalutamida y DAPT sobre la viabilidad de las células LNCaP.

Si bien los ensayos con DAPT son preliminares, sugieren que la inhibición combinada de ambas vías podría potenciar los efectos antiandrogénicos de Apalutamida en células LNCaP, en dosis específicas y bajas de cada droga. Esto apoyaría la hipótesis de un posible efecto sinérgico entre la inhibición del AR y la vía Notch. Resta aumentar el número de réplicas y realizar más ensayos con las distintas combinaciones de drogas para dilucidar la modulación de ambas vías de señalización.

Conclusión:

Los resultados obtenidos muestran que Apalutamida inhibe la vía del AR en células LNCaP, actuando a través de la disminución en la expresión de sus genes diana *PSA* y *TMPRSS2*. Asimismo, la droga moduló procesos funcionales como la viabilidad y migración celular, aunque sin alcanzar significancia estadística, probablemente debido al número limitado de réplicas. En relación con la vía Notch, se observó una modulación diferencial de sus genes blanco con Apalutamida, sugiriendo una posible interacción con la señalización del AR. Los ensayos preliminares con el inhibidor de Notch (DAPT) en combinación con Apalutamida apuntan a un potencial efecto sinérgico, que deberá ser confirmado con un mayor número de experimentos. Nuestro estudio abre la posibilidad de explorar la inhibición simultánea de AR y Notch como estrategia terapéutica en cáncer de próstata.

Bibliografía:

- 1- Anusewicz, D. O. (2021). Notch Signaling Pathway in Cancer—Review with Bioinformatic Analysis. *Cancers*, 13(4), 768.
- 2- Aurilio, G. C.-B. (2020). Androgen receptor signaling pathway in prostate cancer: From genetics to clinical applications. *Cells*, 9 (12), 2653.
- 3- Desai, K. M. (2021). Hormonal therapy for prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 42(3), 354–373.
- 4- Gioukaki, C. G. (2023). Unravelling the role of P300 and TMPRSS2 in prostate Cancer: a literature review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11299.
- 5- Goncharov, A. P. (2025). Signalling pathways in a nutshell: from pathogenesis to therapeutical implications in prostate cancer. *Annals of Medicine*, 57(1).
- 6- Goncharov, A. P. (2025). Signalling pathways in a nutshell: from pathogenesis to therapeutical implications in prostate cancer. *Annals of Medicine*, 57(1).
- 7- Lavery, D. N. (2011). Repression of androgen receptor activity by HEYL, a third member of the Hairy/Enhancer-of-split-related family of notch effectors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17796-17808.
- 8- Li, X. X. (2024). Androgen receptor cofactors: A potential role in understanding prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 173, 116338.
- 9- McCaw, T. R.-S. (2020). Gamma secretase inhibitors in cancer: A current perspective on Clinical performance. *The Oncologist*, 26(4), e608–e621.

- 10- Orzechowska, M. J. (2022). Age- and Stage-Dependent Prostate Cancer Aggressiveness Associated with Differential Notch Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 164.
- 11- Özturan, D. M. (2022). Androgen Receptor-Mediated Transcription in Prostate Cancer. *Cells*, 11(5), 898.
- 12- Qing, Y. W. (2022). Evaluation of NOTCH family genes' expression and prognostic value in prostate cancer. *Translational Andrology and Urology*, 11(5), 627–642.
- 13- Rita, A. (7 de Noviembre de 2023). *Prostata*. Obtenido de Kenhub: <https://www.kenhub.com/es/library/anatomia-es/prostata>
- 14- Rodríguez, A. R. (2019). La próstata: generalidades y patologías más frecuentes. *Revista De La Facultad De Medicina*, 62(4), 41–54.
- 15- Ryan P. Terlecki, M. F. (2018). Prostate physiology: the most diseased organ in the male body. *Grand Rounds in Urology*.
- 16- Sanches, B. D. (2021). Stromal cell interplay in prostate development, physiology, and pathological conditions. *The Prostate*, 81(13), 926–937.
- 17- Sekhoacha, M. R. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, diagnosis, treatment options, and Alternative Approaches. *Molecules*, 27(17), 5730.
- 18- Song, C. Z. (2023). The critical role of γ -secretase and its inhibitors in cancer and cancer therapeutics. *International Journal of Biological Sciences*, 19(16), 5089–5103.
- 19- Wilson, T. K. (2024). Prostate Cancer: A review of genetics, current biomarkers and personalised treatments. *Cancer Reports*, 7(10).

39. – Saúde humana

**Estimulação osteogênica por scaffolds de quitosana-cálcio associados à
sinvastatina: estudo in vitro e in vivo****Autor:** Ruan Henrique Delmonica Barra; ruan.barra@unesp.br**Coautores:** Henrique Rinaldi Matheus, Elisa Mara de Abreu Furquim, Vitor de Toledo
Stuani, Marjorie de Oliveira Gallinari, Diana Gabriela Soares dos Passos**Orientador:** Juliano Milanezi de Almeida; juliano.milanezi@unesp.br

Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA), UNESP

Resumo

Este estudo investigou o potencial osteogênico de scaffolds macroporosos de quitosana funcionalizados com hidróxido de cálcio (CH-Ca) e sinvastatina (SV), desenvolvidos por técnica de separação de fases e liofilização. Inicialmente, ensaios in vitro com células SAOS-2 avaliaram viabilidade, atividade de ALP e mineralização em contato direto e com extratos, revelando efeito sinérgico do cálcio e da SV, mesmo sem suplementação osteogênica. Para o estudo in vivo, foram criados defeitos críticos em calvária de ratos, preenchidos com coágulo, Bio-Oss®, CH-Ca ou CH-Ca-SV. Após 14 e 30 dias, análises microtomográficas, histológicas e histomorfométricas mostraram maior formação óssea e melhor organização do colágeno nos grupos CH-Ca e CH-Ca-SV, com destaque para o CH-Ca-SV, que apresentou maior PTON, expressão de BMP-2 e OCN, além de resposta inflamatória reduzida. Conclui-se que a associação de CH-Ca com SV constitui estratégia promissora para regeneração óssea, alinhando-se aos avanços da engenharia tecidual.

Palavras-chave: quitosana, sinvastatina, regeneração óssea**INTRODUÇÃO**

A perda de tecido ósseo constitui uma condição clínica complexa de natureza multifatorial, frequentemente associada a traumatismos, processos infecciosos, neoplasias, necrose avascular ou distúrbios do desenvolvimento congênito (Karanth et al., 2023). O comprometimento deste tecido acarreta alterações substanciais na arquitetura estrutural, nas propriedades biomecânicas e na funcionalidade do sistema esquelético, além da redução

do suporte mecânico, o que pode levar a limitação da mobilidade (Su et al., 2019). Assim, é evidente que a deficiência óssea exerce efeitos diretos sobre funções metabólicas e hematopoiéticas essenciais, podendo perturbar a homeostase sistêmica, tornando evidente o caráter multidimensional e interdisciplinar desta problemática, que transcende o âmbito ortopédico e envolve implicações significativas para a saúde geral do organismo (Kerath et al., 2023).

Já está bem elucidado que o osso possui uma capacidade regenerativa intrínseca, entretanto, essa resposta endógena é limitada em defeitos extensos ou críticos, nos quais a regeneração espontânea se torna insuficiente para restaurar adequadamente a morfologia e a função do tecido comprometido (Winkler et al., 2018). Nesse contexto, tornam-se indispensáveis as intervenções terapêuticas destinadas à restauração do tecido ósseo, destacando-se os enxertos, que permanecem como o padrão-ouro na prática clínica, especialmente os autógenos, em virtude de sua excelente biocompatibilidade, ausência de imunogenicidade e elevado potencial osteogênico, osteoindutivo e osteocondutivo (Schmidt, 2021). Todavia, tais abordagens não estão isentas de limitações significativas, como a morbidade do sítio doador, a dor pós-operatória exacerbada, o prolongamento do tempo cirúrgico e a restrição quanto à quantidade de tecido disponível para coleta (Sohn & Oh, 2019). Como uma forma de mitigar tais limitações, os profissionais podem recorrer aos aloenxertos, que apresentam maior disponibilidade e menor impacto cirúrgico imediato (Yuan et al., 2024).

Embora essa opção seja viável para mitigar possíveis problemáticas envolvendo dois campos operatórios, os aloenxertos exibem capacidade regenerativa inferior e estão mais

susceptíveis a riscos imunológicos, além de apresentarem resposta biológica menos previsível (Schmidt, 2021). Essas limitações têm impulsionado uma mudança de paradigma no campo das pesquisas em medicina regenerativa, com crescente interesse no desenvolvimento de alternativas terapêuticas baseadas na engenharia tecidual (Yun et al., 2024). Essa abordagem inovadora busca transcender as limitações impostas pelas técnicas convencionais ao integrar biomateriais ativos e moléculas sinalizadoras em scaffolds tridimensionais que replicam de forma biomimética o microambiente ósseo, destacando-se por possibilitar a liberação controlada de fatores de crescimento, dando suporte à migração e diferenciação celular, o que favorece a neoangiogênese e a remodelação tecidual (Abedi et al., 2025). Esses atributos potencializam a regeneração funcional e estrutural do tecido, oferecendo soluções personalizadas e menos invasivas, mas para isso, a escolha de uma composição química biocompatível e bioativa que favoreça e module a integração com o tecido adjacente é essencial (Battafarano et al., 2021).

Dentro desse cenário, a quitosana (CH) tem sido amplamente reconhecida por seu potencial osteogênico desde sua descrição inicial em 1992 (Borah et al., 1992). Estruturalmente, é um polissacarídeo composto por unidades

repetidas de glucosamina e N-acetilglucosamina interligadas por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4), formando cadeias poliméricas que apresentam notável semelhança com as glicosaminoglicanas (GAGs) constituintes da matriz extracelular (Levengood & Zhang, 2014). Essa analogia estrutural confere à quitosana propriedades favoráveis à interação celular e ao remodelamento tecidual (Wang & Stegemann, 2010). Além disso, evidências demonstram sua capacidade de modular positivamente marcadores do metabolismo de tecidos mineralizados, como a atividade da fosfatase alcalina (ALP) e a expressão do colágeno tipo I, reforçando seu potencial de aplicação em engenharia de tecidos duros. Por essas razões, a quitosana tem se destacado entre os biopolímeros naturais como matriz preferencial para o desenvolvimento de scaffolds e sistemas de liberação controlada em medicina regenerativa (Wang & Stegemann, 2010). Adicionalmente, estudos indicam que sua associação com íons cálcio (Ca) potencializa a atividade mineralizadora dos biomateriais, ampliando suas perspectivas no reparo e regeneração óssea (Salama, 2021).

Outro pilar fundamental para a eficácia dos biomateriais empregados na engenharia tecidual reside na arquitetura estrutural com a qual esses materiais são fabricados (Obregon et al., 2015). Nesse contexto, os scaffolds são

definidos como arcabouços tridimensionais capazes de sustentar e direcionar o processo regenerativo por meio de sua macro, micro e nanoestrutura, além de sua composição química e propriedades mecânicas, configurando-se como estratégias altamente promissoras para a reconstrução de defeitos ósseos (Bose & Bandyopadhyay, 2012). Essa abordagem não apenas oferece um controle mais refinado sobre as etapas da regeneração tecidual, mas também viabiliza intervenções personalizadas, com potencial para minimizar complicações pós-operatórias, acelerar o processo reparativo e proporcionar desfechos clínicos mais previsíveis e duradouros (Obregon et al., 2015).

A complexidade inerente aos processos regenerativos *in vivo* está fortemente ligada à resposta inflamatória local, que atua como um modulador central da cicatrização e remodelação tecidual (Hortensius & Harley, 2016). Embora a inflamação inicial desempenhe um papel indispensável na remoção de detritos celulares e na sinalização para o recrutamento de células-tronco e fatores de crescimento, uma resposta exacerbada ou prolongada pode comprometer a formação e a maturação do tecido neoformado, conduzindo a reparo deficiente ou fibrose (Hortensius & Harley, 2016). Diante desse cenário, a engenharia tecidual tem direcionado esforços para otimizar o microambiente inflamatório, de modo a potencializar a

atividade das células precursoras residentes e garantir uma regeneração óssea qualitativa e funcional (Gentile et al., 2016). Nesse contexto, destaca-se a incorporação de scaffolds a compostos bioativos com efeitos pleiotrópicos, como a sinvastatina (SV), que além de seu conhecido impacto na regulação do metabolismo lipídico, possui propriedades anti-inflamatórias, angiogênicas e osteoindutivas, capazes de intensificar e sustentar o processo regenerativo mediante a liberação local controlada de doses bioativas (Gentile et al., 2016). Notavelmente, a quitosana tem sido apontada como um sistema veiculador altamente eficaz para fármacos hidrofóbicos, como a SV, ao melhorar sua solubilidade e, consequentemente, sua biodisponibilidade, ampliando o espectro de aplicações clínicas e fortalecendo sua atuação na regeneração óssea guiada (Soares et al., 2018; Soares et al., 2020).

OBJETIVO

Uma vez estabelecidas as potenciais sinergias entre substâncias bioativas, como a CH, minerais osteocondutores, como o Ca, e agentes farmacológicos capazes de modular a resposta inflamatória, a exemplo da SV, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial regenerativo de um scaffold composto por CH-Ca funcionalizado com SV. Para isso, foram conduzidos ensaios *in vitro* visando caracterizar suas propriedades físico-

químicas, biológicas e osteogênicas, seguidos por experimentação *in vivo*, na qual o biomaterial foi enxertado em defeitos críticos cirurgicamente induzidos nas calvárias de ratos, permitindo a avaliação de sua eficácia na promoção da neoformação óssea em um modelo pré-clínico consolidado.

METODOLOGIA

Triagem das doses bioativas de SV

Foram realizados ensaios de dose e tempo de resposta para determinar as concentrações bioativas ideais de sinvastatina (SV) e seus efeitos osteogênicos em células de linhagem osteoblástica derivadas de osteossarcoma (SAOS-2). As células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^3 células/poço) e mantidas por 24 h para aderência, sendo então expostas a DMEM completo (15% FBS, L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina) com ou sem SV (1, 0,1 ou 0,01 μ M) por 24 h, 72 h ou 7 dias (pré-tratamento — PT). Após cada PT, as células foram cultivadas em meio livre de SV por 14 dias. A viabilidade celular foi avaliada por MTT nos dias 1, 7 e 14, incubando-se as células por 4 h com MTT (5 mg/mL, 1:10 em meio sem FBS), seguido de solubilização dos cristais em isopropanol acidificado e leitura da absorbância a 570 nm. Os resultados foram expressos em % de viabilidade em relação ao controle negativo (CN), considerado 100% em cada tempo (n=6). A concentração de 1 μ M de SV foi definida como ideal,

corroborando estudos prévios do grupo (Soares et al., 2021).

Formulação dos scaffolds de quitosana-cálcio (CH-Ca)

Inicialmente, o pó de quitosana (alto peso molecular, 75–80% de desacetilação; Sigma-Aldrich) foi dissolvido em solução aquosa de ácido acético a 2% (v/v), obtendo-se concentração final de 2% (p/p). Em paralelo, o hidróxido de cálcio (P.A.; Sigma-Aldrich) foi disperso em água para formar suspensão a 1% (p/v). Essa suspensão foi então adicionada gradualmente à solução de quitosana na proporção 1:2, imediatamente após homogeneização por gotejamento sob agitação a 10.000 rpm por 5 min. Os scaffolds foram obtidos por separação de fases em baixas temperaturas e liofilização, resultando em estruturas com ~5 mm de diâmetro. Para isso, as soluções foram vertidas em moldes de teflon e submetidas a congelamento sequencial (-20 °C/4 h, -80 °C/24 h, nitrogênio líquido -120 °C/30 min), seguido de liofilização a -56 °C/24 h, conforme Soares et al., 2020. A arquitetura e composição dos scaffolds foram analisadas por MEV/EDS (JMS-6610V, JEOL, Japão), como pode ser observado na Figura 1, a 12–15 kV, com amostras liofilizadas fixadas em suportes metálicos por fita de carbono e metalizadas com ouro.

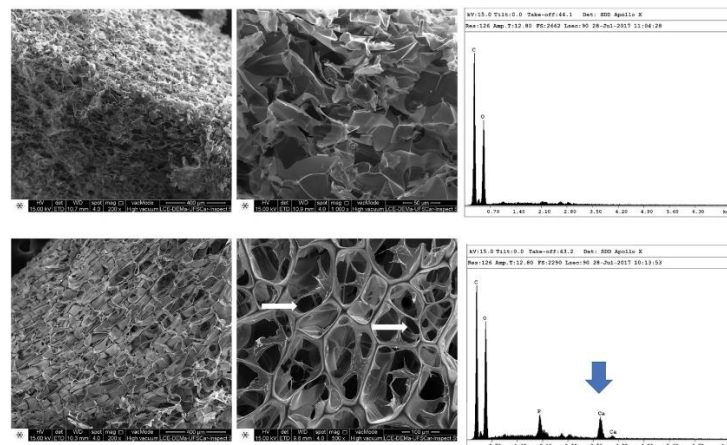


Figura 1. Imagens representativas da análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM) ou espectroscopia de energia dispersiva (EDS) dos andaimes CH e CH-Ca. A arquitetura desorganizada e porosa do andaime CH e a rede porosa organizada e interconectada do andaime CH-Ca, com a presença do componente Ca identificado usando EDS, é exibida. As setas brancas indicam poro dentro do poro em CH-Ca. A seta azul indica a identificação de Ca no gráfico EDS de CH-Ca.

Obtenção dos scaffolds macroporosos contendo SV

Os scaffolds foram submetidos a reticulação (cross-linking) por exposição ao vapor de glutaraldeído. Para isso, foram dispostos sobre uma prateleira no interior de um dessecador, juntamente com uma placa de Petri contendo 10 mL de solução aquosa de glutaraldeído a 25%. Em seguida, uma bomba a vácuo foi acoplada ao sistema para remover o ar e criar um ambiente saturado por vapores de água e glutaraldeído, mantendo os scaffolds incubados por 6 horas.

Após o processo de reticulação, realizou-se a incorporação da sinvastatina (SV) por meio de imersão asséptica dos scaffolds em solução do fármaco, incubando a 37 °C por 24 horas, utilizando uma proporção de 1,5 µL/mm². Por fim, os scaffolds foram

lavados com tampão PBS por 10 minutos para remover o excedente não adsorvido.

Experiência biológica de contato direto

Após a fabricação, os scaffolds foram submetidos a ensaios com células SAOS-2 cultivadas em 500 μ L de meio a 37 °C e 5% CO₂. A viabilidade celular foi avaliada nos dias 1, 3, 7 e 14 (n=2) por Live/Dead® (Invitrogen) e analisada em microscópio de fluorescência (Fluorid®, Life Technologies). A diferenciação osteogênica foi investigada pela atividade de ALP e pela deposição de matriz mineralizada aos 3, 7 e 14 dias (n=6), em meio regular e osteogênico, conforme Soares et al. Para ALP, os scaffolds foram imersos em 500 μ L de sulfato de sódio de louro 0,1%, macerados, centrifugados (4.000 rpm/2 min) e o sobrenadante incubado com monofosfato de timolftaleína (LabTest), normalizado pela proteína total (Lowry). A mineralização foi quantificada por vermelho de alizarina, extraído com cloreto de cetilpiridínio e lido em espectrofotômetro (Synergy H1, BioTek), utilizando scaffolds sem células como branco.

Ensaio com meio condicionado (extratos)

Para avaliar o efeito modulador dos compostos liberados pelos scaffolds, células SAOS-2 foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10⁴ células/poço) até ~80% de confluência. Scaffolds foram incubados em DMEM regular (500

μ L) a 37 °C por 48 h para obtenção dos extratos, que foram coletados e renovados a cada 48 h por 14 dias. Alíquotas de 150 μ L desses extratos foram aplicadas sobre as culturas celulares, permanecendo por 48 h, repetindo-se o processo ao longo de todo o período experimental. Ao final, foram avaliadas a viabilidade celular (ensaio MTT) e a diferenciação osteogênica (atividade de ALP e coloração com vermelho de alizarina), conforme descrito nos ensaios anteriores.

Animais e grupos experimentais

Foram utilizados oitenta ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com cerca de três meses e peso entre 250–300 g. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FOA-UNESP (Processo nº 0397-2020) e seguiu as diretrizes ARRIVE (Kilkenny et al., 2010). Os animais foram alocados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=20), conforme o biomaterial empregado para preenchimento dos defeitos críticos: Grupo Coágulo (coágulo sanguíneo), Grupo Bio-Oss (12 μ g de substituto ósseo bovino desproteinizado, Bio-Oss®), Grupo CH-Ca (scaffold de quitosana-cálcio) e Grupo CH-Ca-SV (scaffold de quitosana-cálcio com sinvastatina para liberação local controlada).

Procedimento cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob sedação e

anestesia geral intramuscular com xilazina (6 mg/kg) e cetamina (70 mg/kg). Após tricotomia e antissepsia, foi feita incisão linear e descolamento dos tecidos moles para exposição da calvária. Confeccionou-se um defeito crítico de 5 mm no osso parietal com trefina sob irrigação, preenchido conforme o grupo experimental. Para referência anatômica, foram feitas duas marcações a 2 mm das margens anterior e posterior do defeito com broca carbide nº 701, preenchidas com amálgama. O fechamento foi realizado com sutura simples interrompida em Nylon 4-0.

Obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados aos 14 e 30 dias por superdosagem anestésica intraperitoneal (lidocaína e tiopental sódico), com 10 animais por grupo em cada período. As calotas cranianas foram removidas em bloco e fixadas em formaldeído tamponado a 4% por 48 h. Após lavagem, parte dos espécimes foi destinada à microtomografia, e o restante desmineralizado em EDTA, processado para inclusão em parafina e seccionado em cortes semi-seriados de 4 µm no eixo longitudinal do defeito. As lâminas foram coradas por H&E, Picrosirius-red para luz polarizada, e submetidas à imunoistoquímica para BMP-2 e OCN.

Microtomografia computadorizada (mCT)

As amostras foram escaneadas em 360° de rotação sob uma voltagem de raios-

X de 50 KV (SkyScan 1174; Bruker-microCT, Kontich, Belgium). As imagens obtidas permitiram avaliar a quantidade de tecido ósseo formado na região das feridas críticas, através do software ImageJ.

Análise histológica

A análise histológica foi realizada de forma descritiva, contemplando a natureza e extensão do processo inflamatório local, o estado da vasculatura, o padrão de celularidade e organização da matriz extracelular nos tecidos conjuntivo e ósseo neoformados, bem como a disposição estrutural dos remanescentes do aloenxerto (grupo Bio-Oss®) e dos fragmentos residuais dos scaffolds.

Análise histométrica de Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON)

Imagens dos cortes corados com H&E foram obtidas em microscópio óptico (AxioLab®) com câmera acoplada (AxioCam®; Carl Zeiss, Gottingen, Germany). A análise histomorfométrica foi realizada no ImageJ, determinando a porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON). Para isso, a área total (AT) do defeito foi delimitada conectando as margens direita e esquerda da calvária com linhas que respeitaram sua curvatura, estabelecendo um raio de 2,5 mm a partir do centro do defeito. A área de tecido ósseo neoformado (ATON), contida em AT, foi calculada em mm² e expressa como percentual da AT.

Análise quantitativa das fibras colágenas através do método de polarização com Picrosírus-red

A análise quantitativa das fibras colágenas foi realizada através do método de polarização com Picrosírus-red (PPR) em microscópio de luz polarizada. Foram capturadas imagens da região do defeito utilizando o software LAS ($\times 400$, Leica LAS 4.12, Leica Microsystems), que permitiu a seleção das cores correspondentes para cada tipo de fibra colágena. As fibras amarelo-esverdeadas foram consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras amarelas avermelhadas foram consideradas maduras e espessas.

Análise imunoistoquímica

Foi empregada a técnica de imunoperoxidase indireta, com desparafinação em xilol, hidratação em etanol decrescente e recuperação antigênica em tampão específico. Após bloqueios da peroxidase endógena e de sítios inespecíficos, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-BMP-2 e anti-OCN, seguidos de anticorpo secundário biotinilado (2 h) e estreptavidina-HRP. A revelação utilizou DAB (Dako, CA, EUA). A BMP-2 foi avaliada por indicar diferenciação osteoblástica precoce, enquanto a OCN é um marcador tardio de maturação/mineralização óssea. A análise semiquantitativa atribuiu escores: 0 (ausente), 1 (baixo), 2

(moderado) e 3 (alto padrão de imunomarcação).

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade e homoscedasticidade. Os resultados das análises de mCT, PTON e Picrosirius-red foram submetidas ao teste ANOVA de duas vias com comparações múltiplas, enquanto os resultados da análise imunoistoquímica foram submetidos ao Teste Kruskal-Wallis e pós teste Student-Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram feitas usando o software GraphPad Prism V8.0.

RESULTADOS

Experiencia biológica de contato direto

As análises de imagens de células vivas e mortas indicaram que a viabilidade celular foi mantida ao longo de todo o experimento em todos os grupos avaliados. Observou-se uma maior formação de aglomerados celulares nos grupos que utilizaram o arcabouço CH-Ca em comparação ao grupo com o arcabouço CH, especialmente aos 14 dias (Figura 2A). Os testes de bioestimulação celular evidenciaram que, sob a influência do meio osteogênico, o grupo CH-Ca-SV apresentou os níveis mais elevados de atividade da fosfatase alcalina (ALP) nos períodos de 3 e 7 dias, embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas em

relação ao grupo CH-Ca (Figura 2C) ($p > 0,05$). Importante destacar que o efeito bioestimulante dos grupos CH-Ca e CH-Ca-SV sobre a atividade da ALP foi detectado mesmo na ausência do meio osteogênico. Nesse contexto, o grupo CH-Ca-SV demonstrou um aumento significativo na atividade de ALP em comparação ao grupo CH nos dias 3 e 7, enquanto o grupo CH-Ca apresentou esse efeito apenas no dia 7 (Figura 2B). O ensaio com vermelho de alizarina revelou que os grupos CH-Ca, CH-SV e CH-Ca-SV exibiram maiores quantidades de matriz mineralizada após 14 dias em relação ao grupo CH, sendo que o grupo CH-Ca-SV apresentou valores significativamente superiores aos demais grupos experimentais (Figura 2B e 2C).

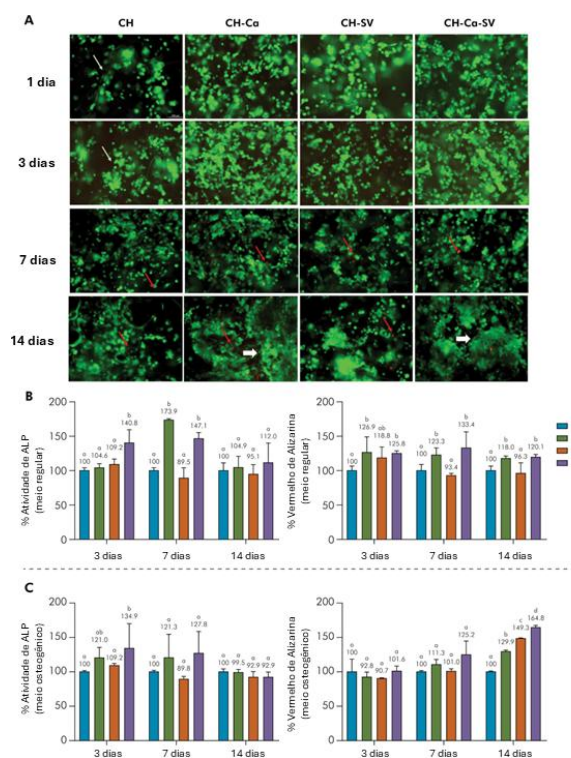


Figura 2. Experiência de contato direto. (a) Imagens representativas do ensaio vivo/morto (20x). Verde = vivo; Vermelho = morto. As setas vermelhas indicam os núcleos das células mortas coradas com homodímero de etídio 1. As setas

azuis indicam células vivas coradas com calceína AM. Setas grandes indicam aglomerados celulares em 14 dias; (b) e (c) gráficos representando a atividade da ALP e o Vermelho de Alizarina testados com meio regular e osteogênico, respectivamente. Os valores representam médias, e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, $n = 6$, $p < 0,05$).

Ensaio de Extração

Foi observado um aumento significativo na viabilidade celular nos grupos CH-Ca, CH-SV e CH-Ca-SV após 1 dia de exposição aos extratos, efeito este que não se manteve nos períodos seguintes (Figura 5a). A atividade da fosfatase alcalina (ALP) apresentou elevação nos grupos CH-Ca e CH-Ca-SV em relação ao grupo CH, com os valores mais elevados registrados no grupo CH-Ca-SV (Figura 3B). Quanto à formação de nódulos mineralizados, o grupo CH-Ca-SV demonstrou um efeito bioestimulante superior, evidenciado por um aumento aproximado de 56,4% aos 7 dias e de 117% aos 14 dias, quando comparado ao grupo CH (Figura 3C). As imagens referentes aos nódulos mineralizados revelaram que, após 14 dias, o grupo CH-Ca-SV apresentou nódulos de maior tamanho e definição, característica não observada nos demais grupos (Figura 3D).

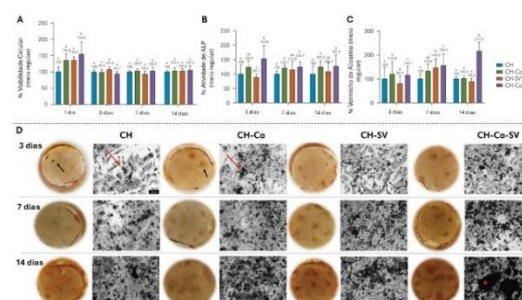


Figura 3. Ensaio de extrato. (A), (B) e (C) gráficos representativos de viabilidade celular, atividade de

ALP e ensaios de vermelho de alizarina, respectivamente. Os valores representam médias, e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA de uma via seguida de Tukey. $n = 6$, $p < 0,05$). (D) Imagens representativas do ensaio de vermelho de alizarina. Setas pretas indicam nódulos observados em fotos digitais de poços. As setas vermelhas indicam pequenos nódulos de mineralização em imagens microscópicas (aumento de 20x). As setas indicam nódulo de mineralização grande e bem definido.

Microtomografia computadorizada (mCT)

Conforme observado na Figura 4, em ambas os tempos analisados, os grupos CH-Ca e CH-Ca-SV foram capazes de aumentar a regeneração óssea em comparação aos grupos Coágulo e BioSS, sendo que a incorporação de SV aparenta aumentar o processo regenerativo do tecido mineralizado.

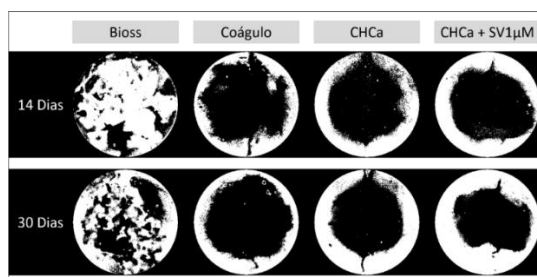


Figura 4. Imagens representativas de cada grupo da análise de microtomografia computadorizada

Análise Histológica

No grupo coágulo, a formação óssea limitou-se às bordas do defeito, acompanhada por fina camada de tecido conjuntivo e intenso infiltrado inflamatório em ambos os períodos (Figura 5 A-E). O grupo Bio-Oss® apresentou neoformação óssea estendida das bordas ao centro, com remanescentes do material infiltrados por tecido conjuntivo vascularizado, focos de mineralização, menor inflamação e maior organização do

tecido conjuntivo aos 14 e 30 dias (Figura 5 B-F). Nos grupos CH-Ca e CH-Ca-SV, houve progressão linear da formação óssea do perímetro ao centro, com focos mineralizados mais evidentes no CH-Ca-SV (Figura 5 C-H). Ambos mostraram infiltrado inflamatório reduzido, tecido conjuntivo vascularizado e organizado, especialmente nas extremidades. Os scaffolds mantiveram-se estruturados até 30 dias, infiltrados por tecido conjuntivo contendo fibras colágenas e fibroblastos em ambos os períodos.

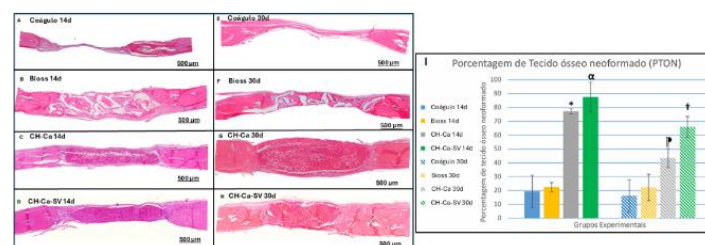


Figura 5. Visão geral dos defeitos de tamanho crítico criados cirurgicamente (DCC) em calvárias de ratos para cada grupo. (A) Grupo Coágulo 14 dias; (B) Grupo Bio-Oss® 14 dias; (C) Grupo QT 14 dias; (D) Grupo QT-SV 14 dias; (E) Grupo Coágulo 30 dias; (F) Grupo Bio-Oss® 30 dias; (G) Grupo QT 30 dias; (H) Grupo QT-SV 30 dias. Coloração com Hematoxilina e Eosina. Barra de escala 500µm. (I) Gráfico mostrando a quantificação ($M \pm DP$) da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON). Testes estatísticos usados: ANOVA Two-way e pós-teste de Tukey. *, diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) quando comparado os grupos QT-14 dias com os grupos C-14dias, Bio-Oss®-14 dias e QT-30 dias. α, diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) quando comparado os grupos QT-SV 14 dias com os grupos C-14dias, Bio-Oss®-14 dias e QT-SV-30 dias. β, diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) quando comparado os grupos QT-30 dias com os grupos Coágulo-30 dias e Bio-Oss®-30 dias. †, diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) quando comparado os grupos QT-SV 30 dias e QT-30 dias.

Análise Histométrica

Aos 14 dias, os grupos experimentais CH-Ca-SV e CH apresentaram valores significativamente maiores de PTON em

comparação aos grupos SHAM e Bio-Oss. Esse padrão foi mantido aos 30 dias, quando a comparação entre os grupos revelou resultados semelhantes. Entre os grupos CH-Ca-SV e CH, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no período de 14 dias; entretanto, aos 30 dias, o grupo CH-Ca-SV demonstrou um aumento significativo na PTON em relação ao grupo CH-Ca (Figura 5 I).

Análise quantitativa das fibras colágenas

As diferenças estatísticas foram observadas somente entre o grupo SHAM e o Grupo CH-Ca-SV, uma vez que o grupo SHAM apresentou uma menor porcentagem de fibras vermelhas em comparação ao grupo CH-Ca-SV nos períodos de 14 e 30 dias. Em relação às fibras verdes, o grupo SHAM mostrou uma maior proporção de fibras imaturas aos 30 dias quando comparado ao grupo CH-Ca-SV (Figuras 6).

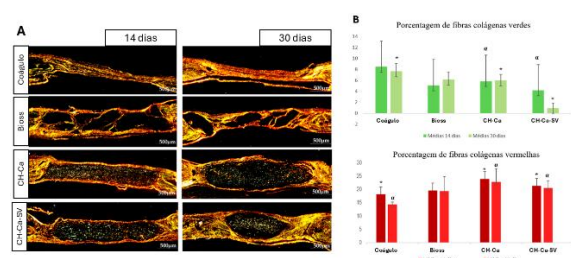


Figura 6. (A) Fotomicrografias da maturação das fibras colágenas nos grupos/períodos através do método de polarização com Picrosírius-red (PPR) em microscópio de luz polarizada. Barra de escala 500µm. (B) Gráficos mostrando a quantificação (M±DP) da porcentagem de fibras colágenas verdes e vermelhas em cada grupo/período. Testes estatísticos usados: ANOVA one-way e pós teste de Tukey. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) quando comparado com o grupo CH-Ca-SV aos 30 dias. *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) quando comparado com os grupos CH-Ca-SV aos 14 dias

(fibras verdes). α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) quando comparado com o grupo CH-Ca-SV aos 14 dias. *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) quando comparado com os grupos CH-Ca-SV aos 30 dias (fibras vermelhas)

Imunomarcação para BMP-2 e OCN

A imunomarcação de BMP-2 revelou diferenças estatisticamente significativas em ambos os períodos avaliados. Aos 14 dias, o grupo SHAM apresentou baixo padrão de imunomarcação, enquanto os grupos Bio-Oss e CH-Ca exibiram padrão moderado, e o grupo CH-Ca-SV demonstrou padrão elevado. De forma semelhante, aos 30 dias, o grupo SHAM manteve baixo padrão de imunomarcação, o grupo Bio-Oss apresentou padrão moderado, e os grupos CH-Ca e CH-Ca-SV exibiram padrão alto (Figura 7).

Quanto à imunomarcação de osteocalcina (OCN), os resultados foram semelhantes aos observados para BMP-2 aos 14 dias: o grupo SHAM apresentou baixo padrão, os grupos Bio-Oss e CH-Ca mostraram padrão moderado, e o grupo CH-Ca-SV apresentou padrão elevado. Aos 30 dias, o grupo SHAM continuou com baixo padrão de imunomarcação, enquanto os grupos Bio-Oss e CH-Ca mantiveram padrão moderado, e o grupo CH-Ca-SV exibiu padrão alto (Figura 7).

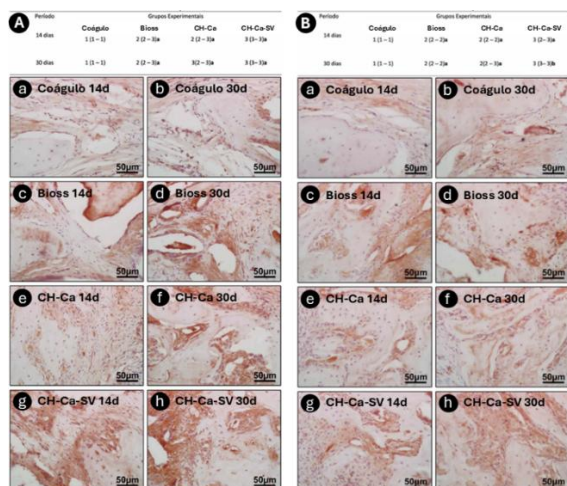


Figura 7. (A) Padrão de imunomarcagem para BMP2/4. Tabela mostrando os escores e medianas do padrão de imunomarcagem para BMP2/4 em cada grupo e período. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós teste Student-Newman-Keuls. Diferenças estatísticas: a, diferença estatisticamente significativa com grupo coágulo no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b – i) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcagem para BMP2/4 aos 14 dias (b, d, f, h) e aos 30 dias pós-operatórios (c, e, g, i) nos grupos coágulo (b, c), Bio Oss® (d, e), CH-Ca (f, g), CH-Ca-SV (h, i). (B) Padrão de imunomarcagem para OCN. Tabela mostrando os escores e medianas do padrão de imunomarcagem para OCN em cada grupo e período. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e pós teste Student-Newman-Keuls. Diferenças estatísticas: a, diferença estatisticamente significativa com grupo coágulo no mesmo período ($p \leq 0,05$); b, diferença estatisticamente significativa com grupo Bio-Oss® no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b – i) Fotomicrografias evidenciando a imunomarcagem para OCN aos 14 dias (b, d, f, h) e aos 30 dias pós-operatórios (c, e, g, i) nos grupos coágulo (b, c), Bio-Oss® (d, e), CH-Ca (f, g), CH-Ca-SV (h, i). Aumento original: 400x. Barras de escala: 50µm. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

DISCUSSÃO

No contexto atual, a busca contínua por materiais e terapias capazes de potencializar o processo de reparo ósseo é motivada pela necessidade de promover regeneração significativa desse tecido, fundamental para o sucesso dos tratamentos reabilitadores (Luo et al., 2024). Este estudo propôs o desenvolvimento de scaffolds macroporosos de quitosana enriquecidos com hidróxido de cálcio

(CH-Ca) e com a incorporação adicional de SV (CH-Ca-SV) como biomateriais promissores para a regeneração óssea. O CH-Ca oferece uma matriz com uma rede interconectada de macroporos, associada à complexação dos íons cálcio à estrutura química da quitosana, permitindo a liberação controlada desses íons (Salama, 2021). Além da avaliação da fase mineral, este trabalho investigou a incorporação de SV como um componente bioativo nos scaffolds de CH e CH-Ca, visando sua aplicação como estratégia de homing celular para a regeneração óssea, aproveitando também suas propriedades moduladoras benéficas sobre a resposta inflamatória. Adicionalmente, o modelo de defeitos críticos cirurgicamente induzidos em calvárias de ratos é amplamente reconhecido na comunidade científica devido à sua fácil reprodutibilidade e à ausência da necessidade de fixação mecânica, diferentemente dos modelos que utilizam o fêmur, tornando esta metodologia um diferencial preciso para trazer os resultados observados *in vitro* para o cenário complexo de um organismo vivo (Spicer et al., 2012). Já está amplamente estabelecido na literatura que o uso de scaffolds à base de quitosana ocupa posição de destaque na engenharia tecidual, especialmente em estratégias voltadas para a regeneração e ganho de tecido ósseo (Levengood & Zhang, 2014). Tal preferência decorre de características

intrínsecas da quitosana, como sua elevada biocompatibilidade, reconhecido potencial antimicrobiano, baixo custo e reduzida toxicidade (Salama, 2021). Contudo, a busca por aprimoramento contínuo tem conduzido a estudos que exploram a associação da quitosana com compostos inorgânicos, a exemplo do cálcio, visando potencializar suas propriedades biológicas e mecânicas (Gentile et al., 2016). Essa combinação tem demonstrado não apenas incrementar a bioatividade, biocompatibilidade, osteocondução e osteoindução do biomaterial, mas também conferir uma taxa de degradação mais lenta, o que favorece a manutenção do arcabouço estrutural durante o processo regenerativo (Soares et al., 2021).

Notavelmente, essa característica pôde ser confirmada pelos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, tanto na presença quanto na ausência de SV. Observou-se que os scaffolds de CH-Ca apresentaram liberação de íons cálcio com um perfil inicial do tipo *burst release* (1–3 h), seguido por liberação sustentada ao longo de até 21 dias. Além disso, mesmo na ausência de meio osteogênico, tanto os scaffolds CH-Ca quanto CH-Ca-SV foram capazes de promover um aumento na deposição de matriz mineralizada, sem, contudo, apresentar diferença estatisticamente significativa entre si. Esses achados são corroborados pelos resultados obtidos *in vivo*, uma vez que

as análises histológica e histométrica evidenciaram não apenas maior volume, mas também superior qualidade do tecido ósseo neoformado nos grupos contendo CH-Ca, com preenchimento que se estendia até o centro do defeito, ao contrário do que se observou nos grupos SHAM e Bio-Oss, onde a neoformação permaneceu predominantemente restrita às margens. Além disso, nesses mesmos grupos com CH-Ca, foram identificadas fibras colágenas mais maduras, bem como um padrão aumentado de imunomarcação para BMP-2 e OCN, indicando um ambiente molecular favorável à osteogênese quando comparado aos controles.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de dose e tempo-resposta, os scaffolds foram incubados em solução de SV a 1 μM para sua funcionalização, seguindo protocolo previamente estabelecido por Soares et al. (2020), que demonstraram a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila da quitosana e a molécula de SV. Essa interação, por se tratar de uma ligação fraca, resultou em um perfil de liberação caracterizado por um *burst release*, com pico em aproximadamente 2 horas, liberando cerca de 25,26% para os scaffolds CH-SV e 30,03% para os CH-Ca-SV, mantendo-se até 21 dias, quando se observou tendência de declínio. Ressalta-se que essa capacidade da quitosana de interagir com fármacos lipossolúveis, como a SV,

contribui para melhorar sua solubilidade e, consequentemente, sua biodisponibilidade para absorção celular.

Os scaffolds biomodificados com SV apresentaram um perfil de degradação gradual ao longo de 14 dias, com perda de massa variando entre aproximadamente 9% e 17%, enquanto o scaffold sem funcionalização manteve-se estável durante o mesmo período. Esse comportamento de degradação controlada é altamente desejável, pois garante uma estrutura temporária que oferece suporte e estabilização celular, permitindo ser progressivamente substituída por tecido neoformado (Luo et al., 2024). No ensaio de viabilidade celular (*Live/Dead*), observou-se a presença de células viáveis em todos os grupos e períodos analisados. Contudo, os scaffolds dos grupos CH-Ca e CH-Ca-SV apresentaram maior densidade celular, atribuída ao elevado grau de porosidade dessas matrizes, que amplia a área de superfície disponível para adesão, interação e migração celular, além de favorecer a infiltração tecidual no interior do scaffold.

Os ensaios de diferenciação osteogênica das células em contato direto com os scaffolds foram conduzidos tanto na presença quanto na ausência de meio osteogênico, com o objetivo de avaliar os efeitos do SV e do Ca(OH)_2 incorporados aos scaffolds sob diferentes condições experimentais.

É sabido que o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato são comumente adicionados em protocolos de diferenciação osteogênica de pré-osteoblastos e células-tronco mesenquimais, por estimularem a maturação osteoblástica, favorecerem a síntese de colágeno e fornecerem íons e fosfato inorgânico necessários para a mineralização (Mbalaviele et al., 2005). Contudo, a exclusão desses suplementos ao testar novos biomateriais permite evidenciar o potencial intrínseco desses materiais em induzir a osteogênese, sobretudo quando se utiliza linhagens de osteoblastos maduros, como a SAOS-2 (Jong et al., 2004). Conforme demonstrado por nossos resultados, na presença de suplementação osteogênica, o scaffold CH-Ca-SV apresentou desempenho superior, elevando significativamente a atividade da ALP aos 3 e 7 dias, além de aumentar a deposição de matriz mineralizada para aproximadamente 64,8% aos 14 dias — valores estatisticamente superiores aos observados nos demais grupos. De forma notável, mesmo na ausência de meio osteogênico, tanto os scaffolds CH-Ca quanto CH-Ca-SV promoveram incremento na deposição de matriz mineralizada, com valores ligeiramente mais elevados no grupo contendo SV, embora sem diferença estatística significativa.

O ensaio de MTT revelou um aumento na viabilidade celular nos grupos CH-

Ca, CH-SV e CH-Ca-SV já no primeiro dia de cultivo, em comparação ao grupo CH, indicando um efeito bioativo inicial proporcionado pelas formulações experimentais. A atividade da ALP foi positivamente modulada nos estágios iniciais (3 dias) nos grupos CH-Ca e CH-Ca-SV, com destaque para os elevados níveis de expressão observados na formulação funcionalizada com SV. Em consequência, o grupo CH-Ca-SV apresentou os maiores valores de deposição de nódulos mineralizados nos períodos de 7 e 14 dias, alcançando um incremento expressivo de aproximadamente 117% aos 14 dias, ocasião em que foi possível identificar nódulos de mineralização volumosos e bem organizados.

De acordo com os dados obtidos, fica evidenciado o efeito biológico positivo do CH-Ca-SV, decorrente da ação sinérgica entre o SV e os íons cálcio incorporados à estrutura do scaffold. A presença de uma fase mineral em scaffolds representa uma estratégia crucial para a regeneração óssea, pois esse estímulo não apenas favorece a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, mas também potencializa a osteocondutividade, acelera o processo regenerativo e otimiza a deposição da matriz mineralizada (Luo et al., 2024). Adicionalmente, o efeito benéfico da SV na regeneração óssea já foi amplamente descrito em associação a diversas composições de biomateriais,

utilizando diferentes linhagens celulares pré-osteoblásticas e de MSCs, incluindo células derivadas de medula óssea e ligamento periodontal, uma vez que a SV exerce papel osteoindutor ao incrementar a atividade e diferenciação dos osteoblastos, além de inibir sua apoptose (Gentile et al., 2016).

Diante desses achados, o ensaio *in vivo* demonstrou que a presença da SV foi capaz de potencializar a formação de tecido ósseo neoformado, uma vez que o grupo CH-Ca-SV apresentou maior quantidade osso formado na análise de mCT, maiores valores de PTON e um padrão superior de imunomarcagem em comparação ao grupo CH-Ca, sobretudo no período experimental mais prolongado. Esse efeito pode estar associado à redução do infiltrado inflamatório observada na análise histológica nos animais tratados com a formulação contendo SV (Gentile et al., 2016; Soares et al., 2021).

Evidências experimentais demonstraram que as estatinas exercem diversas ações benéficas no microambiente ósseo, incluindo a modulação da resposta inflamatória, o estímulo à angiogênese, a promoção da osteoindução e da osteogênese, bem como a inibição da apoptose de osteoblastos e da osteoclastogênese (Torquato et al., 2021). Essas propriedades tornam a sinvastatina uma candidata promissora para aplicações em engenharia tecidual óssea, especialmente quando combinada com

biomateriais dotados de perfil bioativo, como o scaffold CH-Ca (Huh et al., 2015). Por outro lado, a disponibilidade da SV não parece ter impactado significativamente o grau de maturação das fibras colágenas, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos CH-Ca e CH-Ca-SV em nenhum dos períodos analisados.

Outro achado relevante foi a redução na quantidade de tecido ósseo neoformado ao longo do tempo experimental observada nas análises intragrupos dos grupos tratados com CH e CH-SV. Esse comportamento pode ser atribuído à dinâmica fisiológica do processo de remodelação óssea, caracterizado por um ciclo altamente coordenado de ativação, reabsorção, reversão e formação, mediado principalmente pela interação entre osteoclastos e osteoblastos (Fujisawa et al., 2018). Nesse contexto, é plausível supor que, após um período inicial de intensa formação óssea, os eventos celulares relacionados à reabsorção tenham se tornado predominantes, refletindo uma fase mais avançada do processo de remodelação tecidual (Fujisawa et al., 2018). Apesar dessa redução na neoformação óssea aos 30 dias em comparação aos 14 dias nas análises intragrupos, os grupos experimentais CH e CH-SV mantiveram percentuais de tecido ósseo neoformado superiores aos observados nos grupos Coágulo e Bio-Oss no mesmo período, o que indica

um desempenho regenerativo mais favorável, o que também é apoiado pelo fato de que a presença de um grupo com um substituto ósseo de origem xenógena amplamente utilizado, como o Bio-Oss, permite estabelecer um parâmetro comparativo robusto para a avaliação do desempenho de novos scaffolds experimentais (Allen & Burr, 2019).

Os dados obtidos por meio das análises histomorfométrica (PTON) e de imunomarcação corroboram os resultados relatados por Moshiri et al. (2015)²⁶, que, em modelo *in vivo*, demonstraram o potencial osteogênico de scaffolds contendo sinvastatina na reparação de defeitos ósseos. De acordo com esses autores, a SV foi capaz de modular o processo de remodelação óssea, estimulando a formação de tecido no osso cortical, inibindo a osteoclastogênese e exibindo propriedades osteoindutoras e osteocondutoras (Huh et al., 2015), o que é capaz de justificar o maior padrão de expressão de BMP-2 observado no grupo CH-SV reforça o papel das estatinas na indução da diferenciação de células-tronco mesenquimais de origem medular em linhagens osteoblásticas, por meio da regulação positiva da BMP-2, além de seus efeitos antiapoptóticos e de inibição da atividade osteoclástica.

No presente estudo, os scaffolds de CH-Ca funcionalizados com SV demonstraram desempenho notável

frente aos parâmetros analisados, atuando de maneira positiva na dinâmica do reparo ósseo. A maior maturação e organização das fibras colágenas observadas ao longo do período experimental, associadas à formação óssea progressiva que se estendeu das margens até o centro do defeito, à presença de áreas mineralizadas e à preservação da arquitetura tridimensional do arcabouço, sugerem que o biomaterial testado contribuiu de forma significativa para o estabelecimento de um microambiente osteocondutivo e osteoindutivo.

Adicionalmente, os achados oriundos das análises imunohistoquímicas e histomorfométricas reforçam o papel da sinvastatina na modulação de vias celulares críticas para a osteogênese, especialmente pela regulação positiva de proteínas-chave como BMP-2 e OCN, o que também impacta a resposta inflamatória local, favorecendo o processo reparativo (Huh et al., 2015; Fujisawa et al., 2018). Dessa forma, os resultados obtidos apontam para o potencial terapêutico desse sistema como uma estratégia promissora na regeneração de defeitos ósseos críticos, em consonância com as demandas atuais da medicina regenerativa e com os princípios que norteiam a engenharia tecidual.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam o potencial regenerativo de scaffolds de quitosana com rede macroporosa

organizada e interconectada, produzidos por tecnologia simples e de baixo custo, funcionalizados com Ca(OH)_2 como fase mineral moduladora e incorporados a uma dose bioativa de sinvastatina. Essa associação promoveu um efeito sinérgico na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, tanto em contato direto quanto via extratos, mesmo na ausência de suplementação osteogênica, destacando sua viabilidade como plataforma acellular para regeneração de tecidos mineralizados. Nos experimentos in vivo, a presença da sinvastatina potencializou o reparo ósseo em defeitos críticos de calvária de ratos, refletindo-se em maior percentual de osso neoformado, preservação do arcabouço e intensificação da expressão imunohistoquímica de proteínas-chave da osteogênese, como BMP-2 e OCN, em diferentes fases da maturação óssea, além de modular positivamente a resposta inflamatória local. Esses achados reforçam o valor terapêutico da estratégia proposta para a engenharia tecidual óssea e os desafios contemporâneos da medicina regenerativa, destacando a necessidade de estudos adicionais in vivo e ensaios clínicos para aprofundar a compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos e consolidar sua aplicação translacional.

REFERENCIAS

Abedi, N., Sadeghian, A., Kouhi, M., Haugen, H. J., Savabi, O., &

- Nejatidanesh, F. (2025). Immunomodulation in Bone Tissue Engineering: Recent Advancements in Scaffold Design and Biological Modifications for Enhanced Regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 11(3), 1269-1290.
- Allen, M. R., & Burr, D. B. (2019). Bone growth, modeling, and remodeling. In *Basic and applied Bone biology* (pp. 85-100). Academic Press.
- Battafarano, G., Rossi, M., De Martino, V., Marampon, F., Borro, L., Secinaro, A., & Del Fattore, A. (2021). Strategies for bone regeneration: from graft to tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1128.
- Borah G, Scott B, Wortham K. In *Bone Induction by Chitosan*. In: Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP. *Endochondral Bones of the Extremities*, eds. *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier;1992: 206- 215.
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10), 546-554.
- de Jong, D. S., Vaes, B. L., Decherig, K. J., Feijen, A., Hendriks, J. M., Wehrens, R., ... & Steegenga, W. T. (2004). Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(6), 947-958.
- Fujisawa, K., Akita, K., Fukuda, N., Kamada, K., Kudoh, T., Ohe, G., ... & Miyamoto, Y. (2018). Compositional and histological comparison of carbonate apatite fabricated by dissolution–precipitation reaction and Bio-Oss®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29, 1-11.
- Gentile, P., Nandagiri, V. K., Daly, J., Chiono, V., Mattu, C., Tonda-Turo, C., ... & Ramtools, Z. (2016). Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan–gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. *Materials Science and Engineering: C*, 59, 249-257.
- Hortensius RA, Harley BA. Naturally derived biomaterials for addressing inflammation in tissue regeneration. *Exp Biol Med* (Maywood). 2016;241(10):1015-24. doi: 10.1177/1535370216648022.
- Karanth D, Song K, Martin ML, Meyer DR, Dolce C, Huang Y, Holliday LS. Towards resorbable 3D-printed scaffolds for craniofacial bone regeneration. *Orthod Craniofac Res*. 2023. doi: 10.1111/ocr.12645.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010; 8(6):

- e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
- Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184.
- Luo, T., Tan, B., Liao, J., Shi, K., & Ning, L. (2024). A review on external physical stimuli with biomaterials for bone repair. *Chemical Engineering Journal*, 153749.
- Mbalaviele, G., Sheikh, S., Stains, J. P., Salazar, V. S., Cheng, S. L., Chen, D., & Civitelli, R. (2005). β -Catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *Journal of cellular biochemistry*, 94(2), 403-418.
- Moshiri A, Shahrezaee M, Shekarchi B, Oryan A, Azma K. Three-Dimensional Porous Gelatin-Simvastatin Scaffolds Promoted Bone Defect Healing in Rabbits. *Calcif Tissue Int*. 2015;96(6):552-64. doi: 10.1007/s00223-015-9981-9.
- Obregon F, Vaquette C, Ivanovski S, Huttmacher DW, Bertassoni LE. Three-dimensional bioprinting for regenerative dentistry and craniofacial tissue engineering. *J Dent Res*. 2015;94(9 Suppl):143S-52S. doi: 10.1177/0022034515588885.
- Salama, A. (2021). Recent progress in preparation and applications of chitosan/calcium phosphate composite materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 178, 240-252.
- Schmidt, A. H. (2021). Autologous bone graft: Is it still the gold standard?. *Injury*, 52, S18-S22.
- Soares DG, Bordini EAF, Cassiano FB, et al. Characterization of novel calcium hydroxide-mediated highly porous chitosan-calcium scaffolds for potential application in dentin tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108(6):2546-2559. doi: 10.1002/jbm.b.34586.
- Soares, D. G., Anovazzi, G., Bordini, E. A. F., Zuta, U. O., Leite, M. L. A. S., Basso, F. G., ... & de Souza Costa, C. A. (2018). Biological analysis of simvastatin-releasing chitosan scaffold as a cell-free system for pulp-dentin regeneration. *Journal of endodontics*, 44(6), 971-976.
- Soares, D. G., Bordini, E. A. F., Bronze-Uhle, E. S., Cassiano, F. B., Silva, I. S. P. D., Gallinari, M. D. O., ... & de Souza Costa, C. A. (2021). Chitosan-calcium-simvastatin scaffold as an inductive cell-free platform. *Journal of dental research*, 100(10), 1118-1126.
- Sohn, H. S., & Oh, J. K. (2019). Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomaterials research*, 23(1), 9.
- Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K., & Mikos, A.

G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*, 7(10), 1918-1929.

Su, N., Yang, J., Xie, Y., Du, X., Chen, H., Zhou, H., & Chen, L. (2019). Bone function, dysfunction and its role in diseases including critical illness. *International journal of biological sciences*, 15(4), 776.

Thylin MR, McConnell JC, Schmid MJ, et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *J Periodontol*. 2002;73(10)1141-8. Doi: 10.1902/jop.2002.73.10.1141

Wang, L., & Stegemann, J. P. (2010). Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β -glycerophosphate for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(14), 3976-3985.

Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone & joint research*, 7(3), 232-243.

Yuan, X., Zhu, W., Yang, Z., He, N., Chen, F., Han, X., & Zhou, K. (2024). Recent advances in 3D printing of smart scaffolds for bone tissue engineering and regeneration. *Advanced Materials*, 36(34), 2403641.

39. Salud humana

Salud bucal y su relación con parámetros lipídicos en pacientes que acudieron a la cátedra de clínica integrada (2016 - 2025)

Autor: Villalba, Ángel; angelvillalba@founa.edu.py

Co-autores: Diaz-Reissner, Clarisse; cdiazr@founa.edu.py; Segovia, Noelia;
noeliasegovia@founa.edu.py

Orientadora: Cynthia, Jara; cynthiajara@founa.edu.py

Universidad Nacional de Asunción / Facultad de Odontología.

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la relación entre el estado de salud bucal y de parámetros lipídicos en pacientes que acudieron a la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Asunción (FOUNA). El diseño del estudio fue observacional, transversal, retrospectivo y analítico. La población incluyó a pacientes adultos, de ambos sexos, que acudieron a la Cátedra de Clínica Integrada en el periodo comprendido entre los años 2016 y 2025. Participaron las fichas clínicas que cumplían con criterios de inclusión, incluyendo datos sociodemográficos, estado bucal, perfil lipídico y hábito tabáquico. Se analizaron los datos de 150 pacientes, con una edad promedio de 42,84 años y mayoría del sexo femenino (76,7%). El 93,3% presentó sangrado al sondaje y el 75,3% bolsas periodontales. El índice CPO-D promedio fue de 16,12. En el análisis de correlación, se halló una asociación significativa entre el número de dientes perdidos y los niveles de triglicéridos ($p = 0,009$), así como con VLDL ($p = 0,042$). Se observó una correlación negativa entre los dientes cariados y VLDL ($p = 0,042$). Así también se hallaron diferencias significativamente más bajas de HDL en los pacientes fumadores. En cuanto al variables sociodemográficas, la edad se asoció positivamente con el aumento de los triglicéridos, el LDL y VLDL ($p < 0,001$). Los resultados evidencian una relación significativa entre la pérdida dentaria y niveles elevados de triglicéridos y VLDL, así como entre factores sociodemográficos y ciertas las lipoproteínas.

Palabras clave: Triglicéridos, Índice CPO, Sangramiento Gingival en Sondeo

Introducción

La OMS ha reconocido la importancia de las afecciones bucales como problemas de salud pública, ya que afectan a millones de personas en todo el mundo, disminuyendo su calidad de vida y aumentando la carga sobre los sistemas de salud (1). En Paraguay, datos de la Encuesta Nacional sobre Salud Oral realizada en el año 2008 revela que el 98 % de la población presenta algún tipo de afección que compromete su salud bucodental, siendo una cifra alarmante que pone de manifiesto la necesidad de intervenciones tanto preventivas como educativas (2). Para el 2017, si bien se produjo una aparente disminución de la presencia de caries, la misma continuaba mostrando una prevalencia superior al 50% (3). En un reciente estudio paraguayo analizando el estado bucal de adultos mayores, se observó que la severidad de caries global fue media, mientras que el 100% de los pacientes tenía al menos una pieza dentaria perdida (4).

En 1930 se elaboró el índice CPO-D, donde se ha consolidado como un instrumento esencial para evaluar la salud bucal, particularmente en relación con la presencia de caries en la dentición permanente. Este indicador se basa en el recuento de dientes cariados (C), perdidos por caries (P) y obturados (O), sumando dichas categorías y dividiendo el total

entre el número de individuos evaluados. De esta manera, permite no solo valorar el estado dental a nivel individual, sino también identificar patrones y tendencias en poblaciones específicas, lo cual resulta clave para el diseño y la implementación de estrategias de salud pública (5). Se categoriza por nivel de gravedad como muy bajo (1-3), bajo (4-10), moderado (11-20) y alto (21-28) (6).

Así también, las enfermedades periodontales, entre las que se encuentran la gingivitis y la periodontitis, presentan una creciente prevalencia a nivel mundial, alcanzando aproximadamente al 62 % de la población (7). Siendo la gingivitis la fase inicial y más leve, manifestándose principalmente como inflamación y sangrado gingival; en cambio, la periodontitis constituye una forma más avanzada que puede provocar la pérdida del tejido de soporte dental. Estas afecciones comprometen tanto la salud oral como la salud general, ya que también han sido asociadas con diversas enfermedades sistémicas, evidenciando la importancia de abordar la salud bucal desde una perspectiva integral y multidisciplinaria (8,9). Por ejemplo, se ha observado que estas patologías pueden alterar la respuesta a la insulina y están relacionadas con un mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares, diabetes mellitus,

enfermedades respiratorias crónicas e incluso trastornos neurodegenerativos. Algunos estudios han señalado una posible asociación entre niveles elevados de triglicéridos y de colesterol HDL con determinadas condiciones de salud, independientemente de las características sociodemográficas de los pacientes evaluados (8).

Varios estudios han demostrado que la extensión y severidad de la enfermedad periodontal están correlacionadas a factores como el género, la edad, el nivel socioeconómico, ciertas enfermedades sistémicas y estilos de vida. Entre estos últimos, destacan la diabetes, el tabaquismo y la presencia de bacterias específicas en la placa dentobacteriana, tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* y *Prevotella intermedia*. Asimismo, se ha observado una relación entre las periodontopatías y la presencia de enfermedades sistémicas que afectan el metabolismo, la función cardíaca y el sistema inmunológico, en contraste con individuos sin estas afecciones (10).

Tanto la periodontitis como la hiperlipidemia pueden originarse a partir de bacterias y sus metabolitos, creando una interacción bidireccional entre la inflamación y las moléculas liberadas por las células del sistema inmunitario. La endotoxina bacteriana (LPS) es capaz de desencadenar un proceso inflamatorio

mediante la activación del sistema inmunitario, lo cual provoca la destrucción del tejido. Numerosos estudios clínicos han investigado la relación entre estas dos condiciones, con resultados cada vez más contundentes (11). Una metaanálisis reciente sugirió que la periodontitis se asocia con una mayor probabilidad de dislipidemia y que el tratamiento de la periodontitis puede mejorar la dislipidemia, en particular los niveles de HDL y triglicéridos (12).

Los valores de referencia en un perfil lipídico según el Ministerio de Salud Público y Bienestar Social (MSPyBS) son los siguientes: el colesterol total debe ser inferior a 200 mg/dL; el colesterol LDL, conocido como “malo”, debe mantenerse por debajo de 100 mg/dL; el colesterol HDL, o “bueno”, se considera adecuado cuando supera los 40–60 mg/dL (algunos laboratorios aceptan ≥ 35 mg/dL como mínimo) (hombres $<$ de 40 mg/dl y mujeres $<$ de 50 mg/d), siendo valores más elevados más beneficiosos; y los triglicéridos se clasifican como normales cuando están por debajo de los 150 mg/dL (13). El nivel de colesterol VLDL normal es de 2 a 30 mg/Dl (14). Se han observado diferencias en los niveles de colesterol entre géneros, siendo las mujeres quienes, en general, presentan valores más elevados (15).

Por último, es importante destacar que el tabaquismo representa una de las

mayores amenazas para la salud pública y sus efectos nocivos en la cavidad oral están ampliamente documentados. Las personas fumadoras tienen un riesgo considerablemente más alto de desarrollar caries, patologías periodontales y cáncer oral. La exposición continua al tabaco modifica el equilibrio del microambiente bucal, lo que no solo favorece la aparición de diversas enfermedades odontológicas, sino que también dificulta los procesos de cicatrización posterior a procedimientos quirúrgicos (16).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la calidad de vida se define como la percepción que tiene un individuo de su posición en la vida, dentro del contexto cultural y del sistema de valores en el que vive, en relación con sus objetivos, expectativas, estándares y preocupaciones (17). Esta percepción está influenciada por múltiples factores, entre ellos el estado de salud bucal, que constituye un componente esencial del bienestar general. Considerando que las alteraciones bucales como la caries y las enfermedades periodontales continúan siendo altamente prevalentes y que los trastornos sistémicos como las dislipidemias afectan a un número creciente de personas, especialmente en poblaciones con acceso limitado a servicios de salud, resulta fundamental profundizar en el estudio de su posible interrelación. En este contexto, el presente

trabajo adquiere relevancia al proponer una caracterización integral de los pacientes atendidos en la Cátedra de Clínica Integrada de la FOUNA, permitiendo comprender mejor cómo los factores sociodemográficos, los hábitos de salud y los parámetros clínico-laboratoriales se vinculan con las condiciones de salud bucal, aportando así evidencia valiosa para futuras estrategias de promoción, prevención y atención integral.

Objetivos

General:

Evaluar la relación entre el estado de salud bucal y de parámetros sistémicos de pacientes que acudieron a la cátedra de Clínica Integrada entre los años 2016 al 2025.

Los objetivos específicos serán:

1. Caracterizar sociodemográficamente a la población estudiada.
2. Determinar el estado periodontal de los participantes a través del análisis de sangrado al sondaje y la presencia/ausencia de bolsa
3. Determinar el Índice de CPO-D de los pacientes
4. Identificar el estado lipídico de la población estudiada.

5. Analizar la relación entre los parámetros lipídicos con las patologías bucales.
6. Analizar la relación entre los datos sociodemográficos y el hábito de fumar respecto a los parámetros lipídicos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio del tipo observacional, analítico y transversal. La población accesible incluyó a pacientes adultos, de ambos sexos, que acudieron a la Cátedra de Clínica Integrada de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Asunción (FOUNA) en el periodo comprendido entre los años 2016 y 2025. Se incluyeron todas las fichas clínicas de dichos pacientes que presentaron registros completos y legibles, tanto los datos odontológicos como en los parámetros sanguíneos mediante los resultados de análisis laboratoriales, específicamente del perfil lipídico completo. Fueron excluidas aquellas fichas que contenían información ilegible, difícil de clasificar o incompleta.

El muestreo se llevó a cabo por conveniencia, seleccionando todas las fichas clínicas que cumplieran con los criterios de inclusión mencionados. Para acceder a estos datos, se gestionó la autorización correspondiente mediante notas dirigidas a la Dirección de Admisión y al Decanato de la Facultad. Contando

con la aprobación del comité de ética de la FOUNA según informe 013/24 del CEI. Al tratarse de datos secundarios obtenidos de las fichas de pacientes, fue garantizado el anonimato, así como los resultados fueron utilizados solo con fines académicos.

Las variables de interés consideradas fueron: la edad, el sexo, nivel educativo culminado, el lugar de residencia, seguro médico, tener o no hijos, el estado civil, la presencia de sangrado al sondaje, la presencia de bolsas periodontales, la presencia de caries, dientes perdidos o de restauraciones en cada uno de los dientes excluyendo a los terceros molares, tabaquismo, los valores de colesterol total, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos (expresados en mg/dl).

Cada variable fue operacionalizada estableciendo su definición, categorización, dimensiones, escala de medición, indicadores correspondientes y posibles respuestas codificadas mediante el empleo de un formulario de Google (Anexo 3), con el fin de facilitar la recolección de los datos y el análisis estadístico posterior (Tabla 1).

Variables		Frecuencia	%
Edad (rango)	18-26	18	12,00
	27-59	118	78,67
	60-80	14	9,33
Sexo	Femenino	115	76,7
	Masculino	35	23,3
Nivel educativo	Ninguno	2	1,3
	Primario	33	22,0
	Secundario	72	48,0
	Terciario	43	28,7
Residencia	Asunción	39	26,0
	Central	94	62,7
	Interior	17	11,3
Seguro médico	No tiene	91	60,7
	No sabe	16	10,7
	IPS	30	20,0
	Seguro militar	3	2,0
	Seguro policial	2	1,3
	Privado	8	5,3
Hijos	No	23	15,3
	Si	127	84,7
Estado civil	Casado	47	31,3
	Soltero	97	64,7
	Unión libre	6	4,0

Tabaquismo

Se recogieron datos de si el paciente fuma o no fuma arrojando una mínima cantidad de pacientes fumadores de acuerdo con la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Tabaquismo (n=150).

	Frecuencia	Porcentaje
Fumador	13	8,67
No fumador	137	91,33

2. Estado periodontal

El estado periodontal de la mayoría de los pacientes se encontraba comprometido al momento de la inspección. Casi la totalidad de ellos presentaba sangrado al sondaje, mientras que más del 75% presentó bolsa de profundidad igual o mayor a 4mm (Tabla 4).

Tabla 4. Estado periodontal teniendo en cuenta presencia de sangrado al sondaje y profundidad de bolsa periodontal (n=150).

		Frecuencia	%
Presencia de sangrado	No	10	6,7
	Sí	140	93,3
Profundidad de bolsa	< 4 mm	37	24,7
	≥ 4 mm	113	75,3

3. Índice de CPO

Fue registrado el índice de CPO-D, arrojando una media general de 16,12 ± 4,17, el cual corresponde a un nivel de severidad medio (C. Díaz-Reissner, Roldán-Merino, & Casas-García, 2021;

Fuente-Hernández, J, Sumano-Moreno, Ó, Sifuentes-Valenzuela, MC, & Zelocuatecatl-Aguilar, A, 2010). El componente más observado fue el de dientes perdidos con una media de 6,97 ± 3,37 (Tabla 5).

Tabla 5. Índice de CPO-D (n=150).

	Media	DE
Cariado	5,89	3,71
Perdido	6,97	3,37
Obturado	3,27	3,27
Índice CPO-D	16,12	4,17

4. Parámetros lipídicos sanguíneos

La Tabla 6 muestra los valores descriptivos de los parámetros sanguíneos analizados (mg/dl). Se observa una considerable dispersión en los niveles de triglicéridos, lo que sugiere una variabilidad importante en el metabolismo lipídico de los pacientes. Además, resalta la predominancia del LDL en la composición del colesterol total (Tabla 6).

Tabla 6. Estadísticos descriptivos de los parámetros sanguíneos medidos en mg/dl (n=150).

	Media	Máximo	Mínimo	DE
Triglicéridos	146,76	666,00	39,00	92,32
Colesterol total	198,41	382,00	112,00	46,44
HDL	49,77	93,00	22,90	12,42
LDL	120,41	267,00	49,00	36,80
VLDL	30,33	133,00	8,00	19,56

Teniendo en cuenta los parámetros establecidos como valores de referencia por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPyBS), y estratificando los resultados por sexo, se

observó una alta prevalencia de alteraciones en el perfil lipídico, especialmente en lo que respecta al colesterol LDL. Más del 60% de los participantes presentaron niveles elevados de LDL, tanto en mujeres (67,0%) como en varones (74,3%), lo que representa la alteración más frecuente dentro de los parámetros analizados. En contraste, las demás fracciones lipídicas mostraron valores alterados con menor frecuencia: alrededor del 40% de la muestra presentó colesterol total elevado, el 31,3% de las mujeres y el 40,0% de los hombres presentaron triglicéridos elevados, mientras que la disminución del HDL fue menos común (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros lipídicos evaluados de manera dicotómica, estratificados por sexo.

Parámetro	Mujeres		Hombres	
	%	(n)	%	(n)
Triglicéridos elevados	31,3	(36 de 115)	40,0	(14 de 35)
Colesterol elevado	40,0	(46 de 115)	40,0	(14 de 35)
HDL bajo	10,4	(12 de 115)	20,0	(7 de 35)
LDL elevado	67,0	(77 de 115)	74,3	(26 de 35)
VLDL elevado	33,0	(38 de 115)	25,7	(9 de 35)

5. Relación entre parámetros lipídicos y las patologías bucales

Relación entre parámetros sanguíneos y sangrado periodontal

Se compararon los niveles de parámetros sanguíneos entre los grupos con y sin presencia de sangrado periodontal mediante la prueba de

Mann–Whitney U. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros evaluados ($p > 0,05$). No obstante, los niveles de triglicéridos ($p = 0,057$) y VLDL ($p = 0,073$) mostraron una tendencia cercana a la significancia, lo que podría indicar una posible asociación que amerita mayor exploración en estudios posteriores (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación de parámetros sanguíneos (mg/dl) entre pacientes con y sin sangrado periodontal.

Parámetro	Sin sangrado (Media)	Con sangrado (Media)	p-valor (Mann–Whitney U)
Triglicéridos	105,90	149,68	0,057
Colesterol total	179,00	199,80	0,163
HDL	47,80	49,92	0,712
LDL	120,50	120,41	0,874
VLDL	21,80	30,94	0,073

Relación entre parámetros sanguíneos y presencia de bolsa periodontal

Los niveles de parámetros sanguíneos fueron comparados entre los grupos con y sin presencia de bolsa periodontal mediante la prueba de Mann–Whitney U. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL ni VLDL ($p > 0,05$). El nivel de LDL mostró una tendencia cercana a la significancia ($p = 0,065$), sin alcanzar el umbral estadístico establecido (Tabla 9).

Tabla 9. Comparación de parámetros sanguíneos (mg/dl) según la profundidad de bolsa periodontal.

Parámetro	< 4 mm (Mean)	≥ 4 mm (Mean)	p-valor (Mann-Whitney U)
Triglicéridos	145,59	147,14	0,846
Colesterol total	204,95	196,27	0,322
HDL	49,28	49,94	0,946
LDL	129,59	117,41	0,065
VLDL	29,30	30,66	0,944

Relación entre parámetros sanguíneos y el índice CPO

Se analizó la posible asociación entre el índice CPO-D y los parámetros sanguíneos mediante el coeficiente de correlación de Spearman (datos de parámetros sanguíneos no paramétricos). No se hallaron correlaciones estadísticamente significativas entre el CPO y los niveles de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL ni VLDL ($p > 0,05$) en todos los casos). Los coeficientes obtenidos fueron bajos, indicando una ausencia de relación aparente entre estas variables en la muestra evaluada. Dado que el análisis de correlación no evidenció relaciones significativas y considerando la naturaleza distinta de los componentes del CPO-D, se procedió al desglose de sus componentes para un análisis de correlación más detallado.

Con respecto al componente "dientes perdidos", los resultados mostraron una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la pérdida dentaria y los niveles de triglicéridos ($r = 0,213$; $p = 0,009$), así

como una correlación más débil pero también significativa con VLDL ($r = 0,166$; $p = 0,042$). No se observaron correlaciones significativas entre la pérdida dentaria y los niveles de colesterol total, HDL o LDL ($p > 0,05$ en todos los casos).

Con respecto al componente "dientes cariados", los resultados indicaron que no hubo correlaciones estadísticamente significativas entre la cantidad de dientes cariados y los niveles de triglicéridos, colesterol total, HDL ni LDL ($p > 0,05$ en todos los casos). Sin embargo, se observó una correlación negativa débil pero significativa entre dientes cariados y VLDL ($r = -0,167$; $p = 0,042$). Este hallazgo sugiere que, en esta muestra, un mayor nivel de VLDL podría asociarse a una menor cantidad de caries activas.

6. Relación entre datos sociodemográficos y tabaquismo respecto a los parámetros lipídicos

El análisis de correlación no paramétrica de Spearman mostró que la edad se asocia de forma significativa y positiva con varios componentes del perfil lipídico. En particular, se observó una correlación significativa entre la edad y los niveles de triglicéridos ($\rho = 0,352$, $p < 0,001$), LDL ($\rho = 0,391$, $p < 0,001$) y VLDL ($\rho = 0,353$, $p < 0,001$), lo que

indica que, a mayor edad, se tiende a presentar un aumento en estas lipoproteínas. En cambio, no se halló una relación significativa entre la edad y el HDL ($\rho = 0,101$, $p = 0,225$). Además, de acuerdo con la prueba de Mann-Whitney U, solo se encontraron diferencias significativas en los niveles de HDL según tabaquismo. Los fumadores presentan niveles significativamente más bajos de HDL en comparación con los no fumadores ($p = 0,033$), mientras que no se observaron diferencias significativas en triglicéridos, LDL ni VLDL (Tabla 10).

Tabla 10. Relación entre datos sociodemográficos y el tabaquismo respecto a los parámetros lipídicos ($n=150$).

Variables	Triglicéridos P-valor	HDL P-valor	LDL P-valor	VLDL P-valor	Pruebas estadísticas
Edad	<0,001*	>0,05 [#]	<0,001*	<0,001*	Correlación de Spearman
Sexo	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	
Hijos	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	Test U de Mann-Whitney
Tabaquismo	>0,05 [#]	0,033*	>0,05 [#]	>0,05 [#]	
Nivel educativo	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	Kruskal-Wallis
Residencia	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	
Seguro médico	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	
Estado civil	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	>0,05 [#]	

El presente estudio evaluó la relación entre el estado de salud bucal y los parámetros lipídicos en pacientes atendidos en la FOUNA, con una población predominantemente femenina, de mediana edad y escasa cobertura médica. Se observaron asociaciones significativas entre la pérdida dentaria y niveles elevados de triglicéridos ($p = 0,009$) y VLDL ($p = 0,042$), lo que refuerza la hipótesis de una vinculación entre

enfermedades bucales y desórdenes sistémicos, como lo sugieren investigaciones previas sobre la relación bidireccional entre salud oral y estado metabólico (Mendes et al., 2021; Sabharwal, Stellrecht, & Scannapieco, 2021). El índice CPO-D promedio fue de 16,12, clasificado como moderado (C. V. Díaz-Reissner et al., 2024), con predominancia de dientes perdidos, en línea con estudios realizados en adultos mayores.

Respecto a la enfermedad periodontal, se evidenció una alta prevalencia de sangrado (93,3%) y bolsas periodontales (75,3%), sin asociaciones estadísticamente significativas con los parámetros sistémicos. No obstante, se identificaron tendencias cercanas a la significancia con triglicéridos y VLDL ($p \approx 0,05-0,07$) en casos con sangrado, y con LDL ($p = 0,065$) en presencia de bolsas periodontales, como también se ha reportado en estudios previos («Journal of Indian Society of Periodontology», s. f.)(Garcia, Henshaw, & Krall, 2001). Estas asociaciones podrían haber sido subestimadas debido a la utilización de variables dicotómicas en lugar de continuas, lo cual limita la sensibilidad del análisis. Esta decisión metodológica buscó reducir sesgos relacionados con la variabilidad entre operadores clínicos.

Los niveles lipídicos promedio estuvieron cerca o por encima de los

valores recomendados, destacando especialmente el LDL y el VLDL («manual de manejo de enfermedades crónicas no transmisibles – Dirección de Enfermedades no Transmisibles», s. f.; «VLDL Cholesterol», 2021). En relación con variables sociodemográficas, la edad se asoció significativamente con triglicéridos, LDL y VLDL ($p < 0,001$), y los fumadores presentaron niveles significativamente más bajos de HDL ($p = 0,033$), en concordancia con reportes que vinculan el tabaquismo con dislipidemias (Moosazadeh et al., 2024). La pérdida dentaria también mostró una correlación inversa con el número de caries activas y los niveles de VLDL ($r = -0,167$; $p = 0,042$), posiblemente debido a que los pacientes con dislipidemia presentan menos dientes y, por ende, menor riesgo de caries visibles (Feingold & Grunfeld, 2022)(Paquette, Madianos, Offenbacher, Beck, & Williams, 1999). Aun así, la interpretación de estos hallazgos requiere cautela por las diferencias en el procesamiento de muestras y la naturaleza transversal del estudio.

Como limitaciones, se destacan el uso de datos autorreportados, el tamaño reducido de ciertos subgrupos (como los fumadores), y la falta de control sobre factores como dieta, medicación y actividad física. Se recomienda realizar estudios longitudinales que incluyan

variables como glucemia, diagnóstico de diabetes y marcadores sistémicos adicionales para profundizar en la relación entre el estado metabólico y la salud bucodental. Finalmente, se sugiere mejorar el registro clínico por parte de los estudiantes y fortalecer la promoción del cuidado bucal desde el rol del odontólogo, enfatizando su potencial impacto sobre parámetros sistémicos como los triglicéridos y el VLDL.

Conclusiones

Este estudio permitió caracterizar a una población atendida en la Cátedra de Clínica Integrada entre 2016 y 2025, compuesta mayoritariamente por mujeres adultas. El estado de salud bucal evidenció un nivel de gravedad medio en cuanto al índice CPO-D, con una alta proporción de dientes perdidos, y un compromiso periodontal marcado. En cuanto al perfil lipídico, la alteración más prevalente fue la elevación del LDL, seguida por colesterol total elevado y triglicéridos elevados, especialmente en hombres.

El análisis de asociaciones mostró correlaciones débiles pero significativas entre la pérdida dentaria y los niveles de triglicéridos y VLDL, lo que sugiere un posible vínculo acumulativo entre enfermedades bucales y dislipidemias, aunque de baja magnitud. Asimismo, se

halló una correlación negativa entre caries activas y VLDL, cuyo significado clínico merece mayor exploración.

En cuanto a los factores sociodemográficos, la edad fue la principal variable asociada al aumento de triglicéridos, LDL y VLDL. Además, el tabaquismo fue asociado a una disminución de HDL.

Referencias Bibliográficas

- Association of periodontitis with lipid profile: An updated systematic review and meta-analysis—PMC. (s. f.). Recuperado 24 de junio de 2025, de <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9672167/>
- Cuamatzin-García, F., Baez-Duarte, B. G., Zamora-Ginez, I., Martínez-Montaño, M. del L. C., Limón-Cerón, J. F., García-Juárez, A., ... García-Juárez, A. (2024). Relación entre la enfermedad periodontal y el índice triglicéridos / HDL-colesterol en estudiantes universitarios. *Horizonte sanitario*, 23(2), 295-303. <https://doi.org/10.19136/hs.a23n2.5818>
- Díaz-Reissner, C., Roldán-Merino, R.-M., & Casas-García, I. (2021). A cross-sectional study on the level of severity of dental caries in adults. *Journal of Oral Research*, 10(3), 1-10. <https://doi.org/10.17126/%x>
- Díaz-Reissner, C. V., Bareiro-Rolón, V. C., Alvarez-Quinonez, F. L., Morel-Barrios, M. I., Díaz-Reissner, C. V., Bareiro-Rolón, V. C., ... Morel-Barrios, M. I. (2024). Experiencia de caries dental en adultos mayores, Paraguay. *Avances en Odontoestomatología*, 40(2), 53-56. Recuperado de https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0213-12852024000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=pt
- Examen de VLDL: MedlinePlus enciclopedia médica. (s. f.). Recuperado 24 de junio de 2025, de <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003494.htm>
- Feingold, K. R., & Grunfeld, C. (2022). The Effect of Inflammation and Infection on Lipids and Lipoproteins. En *Endotext [Internet]*. MDText.com, Inc. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK326741/>
- Fuente-Hernández, J., Sumano-Moreno, Ó, Sifuentes-Valenzuela, MC, & Zelocuatecatl-Aguilar, A. (2010). *Impacto de la salud bucal en la calidad de vida de adultos mayores demandantes de atención dental*. 29(63), 83-92. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2312/231216366010.pdf>
- García, R. I., Henshaw, M. M., & Krall, E. A. (2001). Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontology* 2000, 25, 21-36. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2001.22250103.x>
- Gupta, R., Sharma, M., Goyal, N. K., Bansal, P., Lodha, S., & Sharma, K. K. (2016). Gender differences in 7 years trends in cholesterol lipoproteins and lipids in

- India: Insights from a hospital database. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(2), 211-218.
<https://doi.org/10.4103/2230-8210.176362>
- Invernizzi-Mendoza, C. R., Cardozo-Vera, R. M., Chamorro-Giménez, S. A., Hetter, M. E. A., Invernizzi-Mendoza, C. R., Cardozo-Vera, R. M., ... Hetter, M. E. A. (2024). Frecuencia de enfermedades periodontales y características clínicas de pacientes atendidos en la Cátedra de Periodoncia de la Universidad Autónoma de Asunción. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 22(1), 3.
<https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2024.e22122403>
- Journal of Indian Society of Periodontology. (s. f.). Recuperado 23 de junio de 2025, de https://journals.lww.com/jisp/fulltext/2013/17010/assessment_of_serum_levels_of_triglycerides_total.9.aspx
- MANUAL DE MANEJO DE ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES – Dirección de Enfermedades no Transmisibles. (s. f.). Recuperado 23 de junio de 2025, de <https://dvent.mspbs.gov.py/manual-de-manejo-de-enfermedades-cronicas-no-transmisibles/>
- Mendes, J. J., Viana, J., Cruz, F., Pereira, D., Ferreira, S., Pereira, P., ... Delgado, A. S. (2021). Blood Pressure and Tooth Loss: A Large Cross-Sectional Study with Age Mediation Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(1), 285.
<https://doi.org/10.3390/ijerph18010285>
- Moosazadeh, M., Ebrahimnejad, P., Kheradmand, M., Modanloo, M., Mardanshah, F., Mahboobi, S., ... Kianmehr, F. (2024). Association Between Smoking and Lipid Profile in Men Aged 35 to 70 Years: Dose–Response Analysis. *American Journal of Men's Health*, 18(3), 15579883241249655.
<https://doi.org/10.1177/15579883241249655>
- Orellana Aguilar, W., Herbas Gonzales, M. J., Calizaya Cartagena, T. C., Mamani Rosas, A. M., Orellana Aguilar, W., Herbas Gonzales, M. J., ... Mamani Rosas, A. M. (2022). Escuelas saludables, Índice de CPOD y ceo-d. *Revista Científica de Salud UNITEPC*, 9(2), 38-45.
<https://doi.org/10.36716/unitepc.v9i2.121>
- Paquette, D. W., Madianos, P., Offenbacher, S., Beck, J. D., & Williams, R. C. (1999). The concept of «risk» and the emerging discipline of periodontal medicine. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 1(1), 1-8.
- Publicaciones – Dirección de Salud Bucodental. (s. f.). Recuperado 25 de junio de 2025, de https://bucodental.mspbs.gov.py/?page_id=423
- Quintero, A. J., Prada, P., Inostroza, C. M., Chaparro, A., Sanz, A. F., Ramírez, V. L., & Morales, H. C. (2011). Presencia de Porphyromonas gingivalis,

Tannerella forsythia, Treponema denticola y Aggregatibacter actinomycetemcomitans en el biofilm subgingival de pacientes diabéticos tipo 2: Estudio transversal. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 4(2), 54-58. <https://doi.org/10.4067/S0719-01072011000200003>

Redalyc. Impacto de la salud bucal en la calidad de vida de adultos mayores demandantes de atención dental. (s. f.). Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2312/231216366010.pdf>

Sabharwal, A., Stellrecht, E., & Scannapieco, F. A. (2021). Associations between dental caries and systemic diseases: A scoping review. *BMC Oral Health*, 21(1), 472. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01803-w>

Sánchez Sánchez, R. J., Feria Díaz, G. E., Miguel Cruz, P. A., Sánchez Sánchez, R. J., Feria Díaz, G. E., & Miguel Cruz, P. A. (2024). Salud bucal y enfermedades sistémicas. *Gaceta Médica Espirituana*, 26. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1608-89212024000100031&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Trindade, D., Carvalho, R., Machado, V., Chambrone, L., Mendes, J. J., & Botelho, J. (2023). Prevalence of periodontitis in dentate people between 2011 and 2020: A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Journal of Clinical*

Periodontology, 50(5), 604-626. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13769>

Valdés Sardiñas, S. A., Hernández Gutiérrez, D., Fernández González, R., Broche Pombo, A., Romero Flores, D., Fernández Hernández, R. A., ... Fernández Hernández, R. A. (2022). El hábito de fumar y su relación con afecciones bucales en adolescentes. *Medicentro Electrónica*, 26(1), 1-14. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1029-30432022000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Vista de Epidemiología de la caries dental en américa latina. (s. f.). Recuperado 24 de junio de 2025, de <https://revistaodontopediatria.org/index.php/alop/article/view/21/211>

VLDL cholesterol: Risks, healthy levels, treatment, and more. (2021, febrero 17). Recuperado 23 de junio de 2025, de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/vldl-cholesterol>

WHOQOL - Measuring Quality of Life| The World Health Organization. (s. f.). Recuperado 25 de junio de 2025, de <https://www.who.int/tools/whoqol>

Xu, J., Zhang, R., Lin, S., Li, W., Li, T., Li, Z., & Liu, F. (2024). Association between periodontitis with the all-cause and cause specific mortality among the population with hyperlipidemia. *BMC Oral Health*, 24(1), 1246. <https://doi.org/10.1186/s12903-024-05055-2>

39.- Salud Humana

Cambio climático y sus nuevos desafíos para el control vectorial de *Triatoma infestans* silvestre en zonas residenciales de Chile central

Autora: **Aguilar, Catalina**. Catalina.aguilar@ug.uchile.cl

Co-autor(es): Ponce, Carla; San Juan, Esteban; Reyes, Martín; Díaz, Belén; Castañeda, Luis; Bacigalupo, Antonella; Llanos, Lorena; Reyes, Carolina.

Orientador/a: Botto-Mahan Carezza; cbotto@uchile.cl

Universidad de Chile/ Facultad de Ciencias

Resumen

El cambio climático se presenta como un nuevo desafío para crear nuevos planes de monitoreo de insectos vectores de enfermedades. *Triatoma infestans* es un insecto hematófago vector del parásito *Trypanosoma cruzi*, responsable de la enfermedad de Chagas en humanos, presente en el Cono Sur de Sudamérica. En Chile, habita zonas mediterráneas-semiáridas, cerca de sectores rurales y domicilios de material ligeros, desde dónde las instituciones especializadas han recopilado hallazgos de este vector y han evaluado la presencia de *T. cruzi* en distintas zonas del país, destacando a la Región Metropolitana como uno de los lugares de mayor presencia del ADN parasitario en vinchucas. Por lo tanto al momento de evaluar la mantención o evaluación de planes de control vectorial en un contexto de cambio climático, hay que tener en cuenta distintos factores, como la presencia de *T. cruzi* y además agregar las respuestas ante las variaciones térmicas de este vector. En este trabajo además de caracterizar la presencia de ADN parasitario de la localidad de Lonquén de Chile Central, se crearon colonias F1 de parentales silvestres de la misma localidad a las cuales a ninfas V, las que fueron aclimatadas a 3 temperaturas de aclimatación distintas (22, 27 y 32°C) evaluando sus rangos térmicos máximos y mínimos a través de protocolos estandarizados, los cuales arrojaron que aquellas aclimatadas a menores temperaturas soportaban temperaturas ligeramente más bajas para (CTmax) y se recuperaban más rápido luego de enfrentar temperaturas frías (CCRT). Lo cual en un contexto de cambio climático, provee información necesaria para la realización de planes preventivos efectivos en un contexto de cambio climático.

Palabras clave: *Triatoma infestans*, Cambio climático, Salud pública

Introducción

Los insectos son un grupo de organismos ectotermos sensibles al cambio climático, ya que las temperaturas ambientales impactan directamente en sus dinámicas poblacionales, su desempeño global y en su estructura comunitaria (Angilletta, 2009). En esta línea, este grupo cobra mayor interés al momento de evaluar cambios térmicos debido a que, dado el inminente calentamiento global (IPCC, 2023), la respuesta de aclimatación de los insectos puede modular su capacidad para recuperarse después de la exposición a temperaturas extremas (Belliard y col., 2019), ya sea en condiciones de laboratorio o en el campo, la manipulación o variación de un factor ambiental tan importante como la temperatura, puede utilizarse como medida de cuantificación de la plasticidad del individuo (forma en cómo responden a perturbaciones ambientales) (Merilä & Hendry, 2014). Además de evaluar la tolerancia y la adaptación térmica es importante incluir a la plasticidad térmica al momento de estudiar cómo los organismos, como los ectotermos, podrían hacer frente al cambio climático (Rodrigues & Beldade, 2020).

Por tanto el calentamiento progresivo de la Tierra podría favorecer por ejemplo, la expansión en los rangos geográficos de insectos, este no sólo resulta en una problemática ecológica sino que también de importancia médica, ya que existen

insectos vectores de enfermedades (Rocklöv & Dubrow, 2020), los cuales son responsables de un número aproximado de 700.000 muertes cada año (WHO, 2014), y estos podrían expandir su distribución dependiendo de su respuesta ante la variabilidad climática (Shuman, 2011; Caminade y col., 2019; Rupasinghe y col., 2022).

Los triatominos, comúnmente conocidos como vinchucas, son insectos hematófagos que se destacan por ser los principales vectores del protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*Kinetoplastea: Trypanosomatidae*) (Jansen y col., 2018). Este parásito es el agente causante de la enfermedad de Chagas en humanos, también conocida como *Tripanosomiasis Americana*, una de las enfermedades infecciosas más importantes y desatendidas del continente americano, debido a que a pesar de su alta carga de morbilidad y mortalidad existe escasa información respecto a las consecuencias de esta afección crónica (Guarneri & Lorenzo, 2021; de Sousa y col., 2024). Se han registrado aproximadamente 157 especies de triatominos (Alevi y col., 2021) y más de 100 especies de mamíferos, mayoritariamente especies silvestres, que actúan como reservorios de *T. cruzi* en la naturaleza (Telleria & Tiabayren, 2017). La transmisión de este protozoo ocurre principalmente por las heces depositadas por las vinchucas sobre el sitio donde

ocurre la picadura o a través de la mucosa del hospedero (Botto-Mahan y col., 2015). Esta enfermedad, endémica en 21 países de América (Pérez-Molina & Molina, 2018) ha mostrado una expansión paulatina a otros continentes debido a las migraciones humanas (Coura & Viñas, 2010) y posee gran impacto a nivel mundial con aproximadamente 6 millones de personas infectadas con el parásito y provocando la muerte de 12 mil personas al año (WHO, 2022).

En Chile existen cuatro especies de triatominos, de las cuales tres son endémicas, *Mepraia spinolai*, *Mepraia parapatrica* y *Mepraia gajardoi*, todas de hábitos diurnos y distribuidas - dependiendo de la especie - en la costa y valles centrales, desde la Región de Arica y Parinacota hasta la Región de O'Higgins (Botto-Mahan y col., 2015), mientras que *Triatoma infestans* (Klug, 1834) corresponde a una especie no endémica de hábitos nocturnos que habita en el cono sur del continente sudamericano favorecido por la asociación con migraciones humanas (Bacigalupo y col., 2015). Actualmente, la distribución geográfica de *T. infestans* en el país abarca desde la Región de Tarapacá hasta la Metropolitana cerca de sectores más rurales (ISP, 2012). Esta especie es reconocida por ocupar hábitats domésticos y peridomésticos como gallineros, cuyeros y corrales de casas (Bacigalupo y col.,

2015), principalmente en viviendas humanas de construcción precaria (Schofield, 1994). En estos casos, la fuente principal de alimentación la constituyen seres humanos, animales domésticos y de corral (Schenone y col., 1980; Schofield, 1994). No obstante, también puede encontrarse de forma silvestre en bromeliáceas terrestres del género *Puya*, o próximas a éstas (Bacigalupo y col., 2006). De las especies de vinchucas mencionadas anteriormente, todas son potenciales vectores de *T. cruzi*. Sin embargo, lo que hace destacar a *T. infestans* es que es considerada como **el principal vector vinculado a la enfermedad de Chagas en Chile**, registrando la mayor notificación de casos, particularmente en la zona central del país (ISP, 2012), considerándose una especie de importancia en salud pública. Por lo cual desde 1991 se implementó un plan de fumigación con el que se logró el control de colonias en entornos domésticos hacia el año 2000, reconociendo a Chile como uno de los países en que la cadena de transmisión por *T. infestans* ha sido interrumpida (ISP, 2014; Canals y col., 2017). Sin embargo siguen encontrándose unidades domiciliarias colonizadas o con hallazgos únicos del vector, incluso luego de la fumigación (ISP, 2018) por tanto, parte del plan de vigilancia de este insecto cuenta con la captura de ejemplares, los cuales son preidentificados por personal

del Programa de las SEREMI de Salud para luego ser enviados a la Sección de Parasitología del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), siendo el Laboratorio de Entomología Médica, el encargado de entregar la identificación definitiva del vector y el Laboratorio de Biología Molecular, de la búsqueda de *T. cruzi* en el contenido intestinal del triatomino (ISP, 2018) para tener un porcentaje del grado de infección por sector y evaluar desafíos de control vectorial en zonas de infección persistente.

Cuando se habla de vectores, es importante también conocer sus rasgos de vida, y para este vector se conoce que, su ciclo de vida se compone de huevo, cinco estadios ninfales que van mudando su exoesqueleto hasta llegar a adultos, y el tiempo de huevo hasta el imago alcanza los 215 días en promedio (Castañera y col., 2003; Martínez-Ibarra y col., 2023; Figura 1).

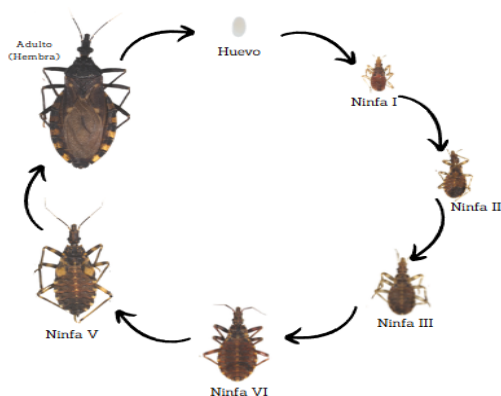


Figura 1: Ciclo de Vida completo de *T. infestans*

Es importante destacar que el tiempo de desarrollo varía según la temperatura de mantención, humedad relativa, especie hospedera e intervalos de alimentación, entre otros factores (Nattero y col., 2011).

Se ha reportado que *T. infestans* tiene una temperatura de preferencia de 24 °C, mientras que su temperatura óptima de fertilidad es a los 27°C (Canals y col., 1997). Al igual que todos los ectotermos, este insecto es susceptible a los cambios en la temperatura ambiental, por tanto los factores climáticos se proponen como el principal mecanismo de regulación de las poblaciones de *T. infestans* (Paaijamans y col., 2013; Bozinovic & Cavieres, 2019; Clavijo-Baquet y col., 2021).

En Chile, un país especialmente vulnerable al cambio climático debido a distintos factores como sus características geográfica (Cordillera, mar, desierto, glaciares, entre otros) (Pinto, 2019), hasta nuestro conocimiento, no hay registro de cómo la temperatura influye en el desempeño y en el tiempo del ciclo de vida en colonias silvestres de esta especie, al igual de cómo el cambio climático podría influir en estos rasgos. Actualmente, al ser considerada como una especie de relevancia en la salud pública, una forma de entender las dinámicas de abundancia y distribución, variables claves en la aplicación de control vectorial, es a través de los datos de ocurrencias y rasgos

fisiológicos de estas especies de artrópodos.

En general son escasos los estudios que relacionan rasgos fisiológicos para especies de la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) a su distribución geográfica (De la Vega & Schilman, 2018). Para triatominos se ha descrito que los rangos de tolerancia térmica aumentan con el aumento de la latitud, donde se denotan mayores rangos de tolerancia a temperaturas más frías (De la Vega & Schilman, 2018). En otras palabras, las vinchucas que habitan zonas más australes poseen mayor termo-tolerancia, es decir, presentan un mayor rango de diferencia entre la temperatura crítica mínima y la temperatura crítica máxima (CTmin y CTmax, respectivamente, por sus siglas en inglés) que aquellas que se distribuyen en zonas tropicales (De la Vega & Schilman, 2018).

En esta investigación se trabajaron datos de ocurrencia, infección y rangos térmicos de esta especie de triatomo en una localidad de Chile central. Esto en busca de presentar posibles nuevos desafíos de control vectorial en un contexto de cambio climático. Esto utilizando datos históricos recopilados desde instituciones de Salud Pública de la zona, y adicionalmente, a través de la creación y mantención de colonias F1, para lograr determinar su temperatura crítica máxima (CTmax) y finalmente el tiempo de recuperación al

coma frío (Chill Coma Recovery Time, CCRT por sus siglas en inglés). Esta medida es ampliamente utilizada y definida como el tiempo que necesitan los individuos para recuperar actividad neuromuscular luego de ser expuestos a temperaturas bajas (menor a sus CTmin) (Gibert y col., 2001; Overgaard & MacMilan, 2017). Todo los individuos utilizados para los experimentos térmicos serán ninfas de estadio V (Figura 1), que corresponde al estadio de desarrollo más extenso antes de la última muda para convertirse en adulto (Martínez-Ibarra y col., 2023); sometidos a un periodo de aclimatación a 3 temperaturas distintas. Para buscar posibles diferencias entre las respuestas ecofisiológicas de los individuos expuestos a distintas temperaturas de aclimatación.

Finalmente, se comparan los resultados obtenidos en este trabajo con otras especies de triatominos de hábitos nocturnos presentes en otros países de América y se relacionan los aspectos ecofisiológicos y la salud pública.

Objetivos:

Evaluar los rasgos de infección y fisiología térmica de la especie de triatomo silvestre de hábito nocturno *Triatoma infestans*.

Objetivos específicos:

- Determinar la capacidad de transmisión de *T. cruzi* de vinchuca de *T. infestans* en

una localidad de la Región Metropolitana de Chile.

- Determinar la temperatura crítica máxima de *T. infestans* aclimatadas a tres temperaturas.
- Determinar el tiempo de recuperación al frío de *T. infestans* aclimatadas a tres temperaturas.

Métodos

-Sitio de estudio y recolección *Triatoma infestans*

La recolección de los individuos se llevó a cabo en la localidad de Lonquén, Región Metropolitana, Chile (33°39'18,5" S; 70°47'16,7" O; Figura 2a), ubicada dentro de la eco-región mediterránea de Chile central. Esta eco-región se caracteriza por presentar una humedad relativa baja, escasas precipitaciones con una media de 300 mm concentradas principalmente entre los meses de mayo y agosto (Pérez y col., 2013), con temperaturas en verano que oscilan entre los 14-29°C y en invierno de 3-12°C (Bonacic & Roa, 2010). La vegetación de este sector se caracteriza por presentar formaciones vegetales como matorral espinoso de la Cordillera de la Costa, bosque espinoso abierto, bosque esclerófilo de la precordillera andina y de tipo bosque esclerófilo costero (Gajardo, 1995). Respecto a la fauna del sector varía entre carnívoros, roedores, murciélagos, aves rapaces y reptiles (Bonacic & Roa, 2010).



Figura 2. a) Puntos de colecta de *Triatoma infestans* en el sitio de estudio. b) Trampa de levadura bajo *Puya* spp.

La combinación vegetativa y faunística hace del sector un ambiente óptimo para los triatomíneos de hábitos silvestres que son usualmente encontrados en pedregales, madrigueras de animales, troncos y nidos de aves, entre otros (Bottomahan y col., 2015). Es importante destacar que la principal fuente de alimentación de *T. infestans* en el sitio de recolección incluye conejo (*Oryctolagus cuniculus*), Degú (*Octodon degus*) y humano (*Homo sapiens*) (San Juan y col., 2023).

Para la detección la capacidad de transmisión de vinchucas de la zona, se analizaron los registros del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) de ocurrencia, infección y estado del ciclo de vida de *T. infestans* a 937 especímenes adultos recolectados en Lonquén, obtenidos desde el año 2010 al 2023.

Los individuos de *T. infestans*, para la creación de colonias de primera generación de parentales silvestres, que serían utilizadas en los tratamientos térmicos fueron capturados en la zona

entre diciembre de 2023 y marzo de 2024, utilizando trampas de levadura que consistían en 5 gramos de levadura y 10 gramos de azúcar disueltas en 100 mL de agua tibia. Las trampas fueron puestas según trapeo dirigido, posicionándolas en la parte inferior de plantas de *Puya spp.* del sector. La activación de trampas se realizaba alrededor de las 19:00 y se revisaban a las 09:00 de la mañana siguiente. Debido a sus hábitos nocturnos, los individuos capturados eran puestos en frascos no transparentes etiquetados con su respectivo código de trampa y mantenidos posteriormente en un contenedor cerrado en un lugar fresco y transportados al laboratorio. En total fueron recolectados 64 individuos desde terreno, de los cuales ocho eran ejemplares adultos.

Mantención de colonias *T. infestans*

Los frascos de parentales recolectados en terreno fueron trasladados al laboratorio y dispuestos en una cámara de crianza a $26,6 \pm 2,7^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $63 \pm 9,5\%$ de humedad relativa, un fotoperiodo de 12:12 h L:O, en frascos blancos (1 L) con un trozo de papel plegado como refugio. Los adultos fueron utilizados para reproducción, obteniendo descendencia en el laboratorio (F1), asegurándose de que las ninfas resultantes de estos cruzamientos estuvieran libres de *T. cruzi* a través del tratamiento de los huevos. Para

esto último, los huevos eran removidos semanalmente de los frascos de cruzamientos, lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, y almacenados en contenedores plásticos etiquetados con la fecha y cantidad de huevos recolectados por frasco de reproducción (Garrido y col., 2021). Cada frasco de colonias F1, tenía alrededor de 35 ninfas, las cuales eran observadas diariamente hasta llegar a su estadio V, utilizado para los tratamientos experimentales.

Para la alimentación se utilizaron roedores de laboratorio (*Mus musculus*) anestesiados, libres de infección por *T. cruzi*, en base a protocolos de alimentación descritos previamente (Garrido y col., 2021). Los parentales y las ninfas se alimentaron ad libitum semana por medio, para asegurar su muda. Todos los procedimientos experimentales fueron autorizados por el CICUA- Universidad de Chile (Certificado No 23733 –FCS– UCH-e1).

Estudio de parámetros fisiológicos

Al llegar las ninfas al estadio V, dejaban de ser alimentadas para proceder a su aclimatación, donde se dispusieron en cámaras de aclimatación a tres temperaturas (22° , 27° y 32°C), con condiciones de fotoperiodo y humedad similares a la cámara de colonias (F1). Para esto, los individuos eran puestos en frascos (100 mL; máximo de 15 ninfas por

frasco) envueltos en papel de aluminio para oscuridad y con perforaciones en sus tapas para aireación.

Cada frasco se etiquetaba de acuerdo con el tratamiento térmico y fecha de la última muda. Se obtuvieron un total de 152 ninfas, las cuales se repartieron entre los distintos tratamientos experimentales. Después de estar sometidas a dos semanas de aclimatación, se realizaron las mediciones de rangos térmicos (CT_{max} y CCRT) que fueron definidas como las temperaturas a las cuales los individuos perdieron actividad motora y dejaron de responder a estímulos mecánicos suaves. El tiempo de recuperación al frío (CCRT), según temperatura de aclimatación, se definió como el tiempo en el cual las ninfas volvían a obtener movilidad y eran capaces de volver a su posición de caminata. Para CT_{max} se utilizó un tamaño de muestra de 56 y para CCRT 53, donde se repartieron lo más equitativamente en 3 grupos de temperatura de aclimatación.

Determinación de temperatura crítica máxima (CT_{max})

Para determinar la temperatura crítica máxima (CT_{max}), definida en literatura como “aquella temperatura final en la que los organismos colapsan en ensayos de aumento de temperatura constante” (Lutterschmidt & Hutchinson, 1997), se adoptaron los protocolos implementados por De la Vega & Schilman (2018), y

Lighton & Turner (2004). Se utilizó una cámara climática con control de la temperatura ambiente del interior mediante un equipo controlador SSI PELTS-5, colocando en su interior una cámara de vídeo digital y un aro de luz para la iluminación del contenedor con el fin de registrar la actividad motora de los insectos, y los individuos eran puestos en seis placas de plástico transparentes, para tener seis registros simultáneos), luego selladas con dos capas de film plástico transparente, en las cuales se hicieron dos agujeros pequeños que permitieran el traspaso de aire. El procedimiento consistía en que el equipo controlador SSI PELTS-5 era configurado para empezar una rampa de aumento de la temperatura, partiendo con 27°C durante 10 minutos de manera preliminar y luego a una tasa de aumento constante de 0,25°C por minuto. El tiempo de medición se basó en la actividad locomotora de los individuos, enfocándose en dos puntos importantes, el primero cuando el insecto pierde la capacidad de escape ante la fuente de calor, esto se definió como el momento en el cual quedaba con el vientre hacia arriba, sin poder volver a su posición natural. Si esto no ocurría se utilizaba el momento cuando su movimiento disminuía categóricamente (i.e., sin movimiento en el radio de la placa en 30 segundos). El segundo punto se consideraba como el momento en que ya presentaban

espasmos musculares, quedando completamente inmóviles, cuando todos los ejemplares cumplían estos parámetros, cesaba la filmación y terminaba el ensayo.

Determinación del tiempo de recuperación al frío (CCRT)

Para esto se adoptaron los protocolos implementados por De la Vega y col. (2015), en donde luego de dos semanas de aclimatación los individuos eran puestos individualmente en tubos falcon de 15 ml los cuales eran dispuestos en un contenedor de plumavit (10 x 30 x 18 cm), el cual fue cubierto con hielo picado y además a uno de los tubos vacíos se le agregó un termómetro para monitorear la temperatura dentro de los tubos. Una vez dispuestos todos los individuos en sus respectivos tubos, se dispuso el contenedor dentro de un refrigerador a 4°C en donde se dispusieron por un tiempo aproximado de 4 horas, monitoreando el termómetro constantemente (la temperatura al interior de los tubos varió entre los 0-1,3°C). Después de 4 horas, los individuos eran colocados individualmente en posición ventral en placas Petri, en una habitación aclimatada a 27°C, en donde se grabó con una cámara de video digital hasta que los insectos asumieran posición de caminata también conocido como “rollover speed”, esta velocidad de vuelco se considera una medida proxy del desempeño fisiológico en artrópodos

(Lutterschmidt & Hutchinson, 1997; Angilletta, 2009), a este tiempo de grabación se le denominó tiempo de recuperación al frío (CCRT). Cada individuo se masó después del ensayo en una balanza analítica ($\pm 0,1$ mg).

Análisis estadísticos

Para el análisis de datos se utilizó el software RStudio versión 4.2.1. Primeramente, se compararon los pesos de las ninfas V utilizadas para los tratamientos térmicos, en relación con la temperatura de aclimatación, mediante un ANOVA para evaluar la distribución de los pesos de las ninfas utilizadas en el experimento, para evitar algún tipo de influencia o desequilibrio hacia un grupo u otro.

Para los datos obtenidos desde el ISP, se agruparon en tablas para organizar a los individuos reportados en el intra y peridomicilio entre 2010 y 2023, además del cálculo de porcentaje de individuos positivos a *T. cruzi* en relación con el total de analizados según los resultados de PCR, realizados en el laboratorio de la misma institución.

Para CTmax, preliminarmente se evaluó la existencia de diferencias significativas entre el peso de las ninfas y su temperatura crítica máxima, el cual descartó la existencia de posibles influencias del peso y por tanto en los resultados del experimento se prosiguió con el análisis sin

esta variable. Como los valores residuales de CTmax no cumplían con el supuesto de normalidad y dado lo acotado del data set (1 factor, 3 niveles), se optó por una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, y comparaciones a posteriori para detectar las diferencias específicas entre los grupos.

Para CCRT se utilizó el mismo procedimiento analítico anterior, y dado que los datos tampoco cumplían con el supuesto de normalidad, fueron tratados a través de una prueba no paramétrica Kruskal- Wallis y un análisis a posteriori.

Resultados y Discusión

-Detección de *T. cruzi*

De los 937 especímenes, se obtuvo información de 624 vinchucas a las cuales se les realizó la prueba de PCR para encontrar la presencia de ADN parasitario, estos análisis arrojaron que 551 dieron resultados positivos para *T. cruzi*, 18 fueron negativas, 40 se consideraron no aptas para la realización del examen (ya sea por la condición en las que fueron almacenadas u otro factor externo) y por último 114 arrojaron que no fue detectable, debido a que el ADN no estaba en la condición necesaria para ser detectable a través de la prueba.

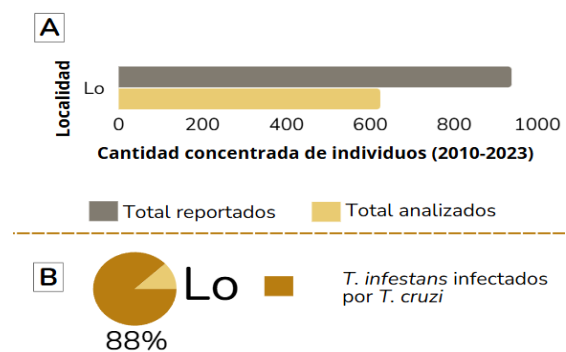


Figura 3: A) Se muestra en gris la cantidad de *T. infestans* que han sido registrados en el intra- y peri-domicilio en Longén desde 2010-2023 y en amarillo la cantidad de *T. infestans* testeados con PCR por presencia de *T. cruzi*. B) Porcentaje de individuos positivos a *T. cruzi* en relación al total de los analizados.

Estos datos nos permiten tener un poco de contexto, para entender la importancia del conocimiento actualizado sobre insectos vectores y su capacidad vectorial, como vemos en los resultados el 88% de los individuos de *T. infestans* que lograron ser analizados a través de PCR mostraban presencia del parásito, y como se mencionó anteriormente, en esta localidad en específico se encontró que gran parte de la dieta de estas vinchucas corresponde a humanos (San Juan y col, 2023) y es importante además, tener en cuenta que los especímenes que llegan al Instituto de Salud Pública, generalmente son insectos que fueron encontrados al interior de domicilios y en zonas peri-domiciliarias. El conocer esta información nos permite darle relevancia a la investigación de esta especie en localidades que presentan altas

persistencias de vectores infectados, y se conoce que al menos la Región Metropolitana presenta el valor más alto de positividad en las pruebas PCR con un 71,7%, en comparación a otras regiones del país entre el año 2014-2017 (ISP, 2018). En áreas habitadas como Lonquén y otras zonas con presencia de *T. infestans* en el país, es importante continuar el seguimiento investigativo de este vector, a diferentes escalas, para poder generar y fortalecer estrategias de control viables en el tiempo dado que siendo estos, organismos ectotermos, el agregar los rasgos de respuesta térmica a estos análisis da una nueva visión para mantener estas estrategias preventivas a futuro, en un contexto de cambio climático global.

-Temperatura Crítica Máxima

Para los resultados de la evaluación de rangos térmicos de ninfas V F1 que se obtuvieron de parentales silvestres de la zona de Lonquén; primero se evaluó si los pesos influían en los resultados de CTmax, una correlación de Spearman mostró que no existía una relación significativa entre el peso y CTmax ($p = 0,0018$, $p = 0,989$). Por lo tanto, en los análisis posteriores no se consideró el peso como covariable. Los resultados del análisis no paramétrico Kruskal-Wallis, evaluando la temperatura de aclimatación y la CTmax, mostró diferencias significativas entre las temperaturas ($p = 5,112E-06$) y en análisis

a posteriori con la prueba de Dunn, ajustado mediante el método Bonferroni, reveló diferencias significativas entre las tres temperaturas (Tabla 4). Estos resultados indican que la temperatura de aclimatación influye significativamente en los valores de CTmax, aumentando conforme incrementa la temperatura de aclimatación.

Tabla 1. Resultados de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples entre temperaturas de aclimatación. El valor de p ajustado (Bonferroni) para comparar el efecto de las temperaturas de aclimatación con los valores alcanzados en el tratamiento de CTmax. Se presentan valores z (z-score) y los valores de probabilidad (p). Se destacan los valores significativos ($p < 0,05$).

	z-score	p
22 - 27°C	-2681,00	0,022
22 - 32°C	-4895	2,953E-06
27 - 32°C	-2635,0	0,025

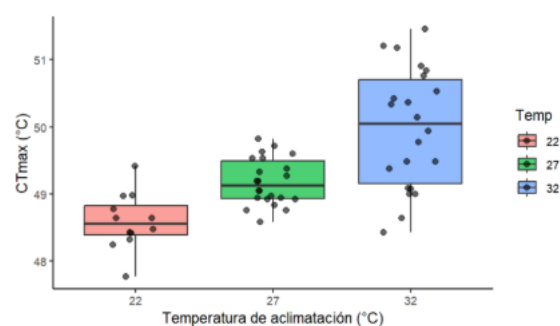


Figura 4. Temperatura crítica máxima (CTmax, °C) según temperatura de aclimatación (22, 27 y 32°C).

-Tiempo de Recuperación al Frío

Preliminarmente se evaluó el peso de los insectos para descartar alguna influencia en los tiempos de recuperación, mediante una correlación de Spearman, mostró que no existían diferencias significativas entre estas variables ($p = 0,076$, $p = 0$) y por tanto en los análisis posteriores no se consideró el peso como covariable. El resultado del análisis no paramétrico mostró que el tiempo de recuperación al frío (CCRT) varía significativamente entre las temperatura de aclimatación (Tabla 5). Las comparaciones a posteriori realizadas con una prueba de Dunn ajustado por Bonferroni, revelaron que las ninfas aclimatadas a 32°C presentaron mayores tiempos de recuperación con diferencias altamente significativas ($p < 0,001$), comparadas con las aclimatadas a 22°C. También se observó que entre las aclimatadas a 22°C con las de 27°C, no hubo diferencias significativas entre los tiempos de recuperación ($p = 0,568$) (Tabla 5), finalmente entre las aclimatadas a 27°C y 32°C se encontraron diferencias significativas ($p = 0,028$). Estos resultados sugieren que, existe un efecto significativo de la temperatura a la que son expuestas las ninfas de forma prolongada sobre su capacidad de recuperación al frío. Todos los individuos sobrevivieron al tratamiento.

Tabla 2. Resultados de las comparaciones por pares entre las temperaturas de aclimatación para el tiempo de recuperación al frío (CCRT), obtenidos mediante la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni. Se presentan el z-score, los valores p ajustados y se destacan los valores significativos ($p < 0,05$).

	z-score	p
22-27°C	-1,313	0,5680
22-32°C	-3,788	0,0005
27-32°C	-2,601	0,0280

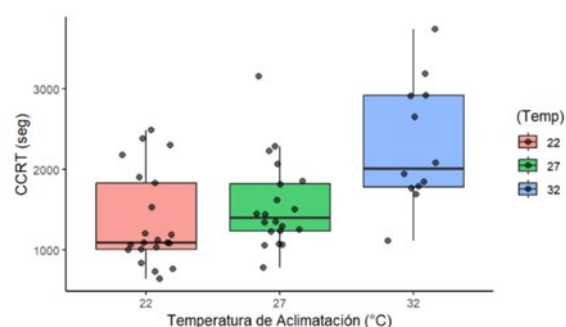


Figura 5. Tiempo de recuperación al frío (CCRT) de las ninfas V, medido en segundos, según temperatura de aclimatación (22, 27 y 32°C).

Tabla 3. Resultados promedio de tratamientos térmicos a las tres temperaturas de aclimatación.

	22°C	27°C	32°C
CTmax (°C)	49,05±1,06	49,31±0,6	49,97±0,89
CCRT (seg)	1352,4±580	1552,5±551,3	2300,7±765,3

Para interpretar los resultados obtenidos en los tratamientos experimentales de cambios térmicos en las ninfas de *T. infestans*, es fundamental considerar la escala biológica propuesta por Vannier

(1994). Esta escala define las respuestas de los organismos frente a eventos térmicos, abarcando puntos claves como la temperatura máxima letal, la óptima y la mínima letal, además de estados intermedios como el estupor y el coma inducidos por calor o frío. Estos puntos fisiológicos actúan como límites térmicos y son herramientas valiosas para medir las respuestas de los individuos frente a cambios climáticos (Sinclair y col., 2016). Estos puntos fisiológicos son utilizados como límites térmicos que pueden ser usados en la medición de respuestas de los individuos ante cambios climáticos (Sinclair y col., 2016).

Para CT_{max} se encontraron diferencias significativas entre las temperaturas máximas alcanzadas por cada grupo aclimatado (Tabla 1), además se observó una tendencia, que mostraba que los individuos aclimatados a mayores temperaturas (32°C) presentaron una mayor CT_{max} (49,97±0,89°C), en comparación a los individuos aclimatados a temperaturas menores (Tabla 3). La estimación de la temperatura máxima crítica para la especie ha sido descrita previamente para colonias de *T. infestans* provenientes de varias generaciones de laboratorio en Argentina (de la Vega y col., 2015; de la Vega & Schilman, 2018; Belliard y col., 2019), que variaron en un rango de entre los 53,22±0,88°C y los 47,47±1,24°C, por tanto nuestros

resultados se encuentran dentro de rangos ya descritos, en específico la CT_{max} de individuos a 27°C, ya que las colonias utilizadas en los experimentos de triatominos de Argentina estaban aclimatadas a 27-28°C.

El hecho de que las ninfas se mantengan a una temperatura de aclimatación constante por periodos extendidos de tiempo puede favorecer a que los organismos puedan mantener sus procesos fisiológicos dentro de un rango ambiental térmico (Willmer y col., 2009), modulando también su capacidad de recuperarse a temperaturas extremas (Belliard y col., 2019). Siguiendo esta línea, cierto aspecto destacable de recalcar es el hecho de que en múltiples trabajos en donde se han expuesto características fisiológicas ante respuestas térmicas en triatominos, se han realizado en colonias de larga data de crianza en laboratorio, a diferencia de las utilizadas en esta investigación que provenían de parentales recolectados en campo, dando paso a la primera generación de la colonia de la localidad de Lonquén. Muchos experimentos de laboratorio controlados han demostrado que la resistencia fisiológica puede aumentar exponiéndolos de forma prolongada a ciertas temperaturas de aclimatación, incluso a exposiciones agudas de forma breve no letales, cambiando su rendimiento fisiológico (Sgró y col., 2016). Aparte, al evaluar colonias que se han desarrollado

por generaciones en condiciones controladas hay que tener en cuenta los posibles efectos transgeneracionales, como los efectos maternos (Mousseau & Fox, 1998), donde el entorno experimentado por la madre influye en la expresión de fenotipos (Sgró y col., 2016) y por tanto también en su respuesta ante situaciones de estrés térmico. Al momento de querer comparar resultados, es fundamental considerar la influencia de la historia de vida generacional de las colonias, ya que los efectos maternos y el desarrollo en ambientes controlados afectan directamente su plasticidad. Esto se debe a que las condiciones climáticas naturales no son estáticas, sino que varían en escalas temporales y espaciales (Belliard y col., 2019), lo que representa un desafío constante para los insectos frente a la variación térmica (Pörtner y col., 2006). Al ser organismos ectotermos, el metabolismo de los insectos también es dependiente de la temperatura ambiental (Neven, 2000), por tanto un aumento de la temperatura ambiente incrementa las diferencias intraespecíficas en las tasas metabólicas (de la Vega & Schilman, 2018) y a su vez una mayor tasa metabólica implica una mayor conversión de nutrientes y frecuencia de picaduras para estos insectos (Rolandi & Schilman, 2012). En este contexto, en términos de su importancia como vectores de enfermedades, es relevante señalar la

sensibilidad térmica de *T. infestans*, al ser uno de los principales vectores de la enfermedad de Chagas (Schofield y col., 2006) y además de tener una alta presencia y persistencia en zonas domiciliarias como Lonquén.

El tiempo de recuperación al frío (CCRT) para ninfas de V estadio de *T. infestans* mostró diferencias significativas entre el tiempo que se tardaban los individuos aclimatados a 32°C en recobrar su posición natural (vientre hacia abajo), en comparación con aquellas a temperaturas más bajas. Este resultado sugiere que la exposición sostenida a ciertas temperaturas influye directamente en sus tiempos de respuesta ante un estrés térmico frío, haciéndolas más vulnerables ante posibles frentes climáticos. Esta baja tolerancia probablemente limitaría su dispersión hacia regiones de ambientes templados debido a que la tolerancia al frío se asocia a una habilidad específica para mantener la homeostasis (MacMillan y col., 2012), que disminuye al estar expuestos de manera prolongada a temperaturas altas. Esto es consistente con resultados de trabajos como de la Vega y col. (2015) y de la Vega & Schilman (2018) que evaluaron el nicho geográfico y la ecología según la tolerancia térmica de triatomíneos, donde aquellos individuos de ambientes más variables poseían rangos de tolerancia térmica más amplios que aquellos de ambientes estables. El tiempo de

recuperación al frío (CCRT) podría estar influido por el periodo de exposición a ciertas temperaturas de aclimatación a lo largo de generaciones.

Estudios previos han demostrado que la CCRT depende significativamente tanto de la temperatura de crianza y aclimatación de los individuos como de la duración de la exposición a dichas temperaturas (Hoffmann y col., 2005; Rako & Hoffmann, 2006).

En síntesis, en este trabajo se ha descrito y caracterizado una localidad de Chile Central, en dónde existe una alta incidencia de vinchucas infectadas de forma positiva encontradas al interior de áreas domiciliarias y peri-domiciliarias, lo cual solo demuestra que, si bien las estrategias de fumigación y control han ayudado a mantener a raya los contagios, siguen encontrándose nuevos hallazgos de este vector, en localidades urbanas, lo que representa un claro riesgo persistente a la salud pública. Esto va de la mano con la variabilidad de la temperatura ambiental, ya que esta determina el rango reproductivo de los insectos, su comportamiento y supervivencia, e incluso es conocido que los patógenos al interior de estos insectos tienden a disminuir sus periodos de incubación en exposición a temperaturas cálidas (WHO, 2014) y la variabilidad térmica cobra importancia bajo un contexto de cambio climático, influyendo en los rasgos del ciclo de vida y

la aptitud más allá de cualquier efecto de la temperatura media (Terblanche y col., 2010; Bozinovic y col., 2011). Por tanto se deben incorporar los rasgos de respuestas térmicas de estos insectos al momento de evaluar los planes de control vectorial, en especial en un país como Chile, sensible a la variabilidad térmica y en dónde las modelaciones climáticas a futuro indican un aumento térmico progresivo al igual que una disminución de las lluvias (Pino y col., 2015; MMA, 2015). En cuanto a las respuestas fisiológicas ante tratamientos térmicos en individuos aclimatados a distintas temperaturas de forma constante encontradas en esta investigación, se ha reflejado que ante un aumento progresivo de temperaturas, los individuos podrían requerir un esfuerzo metabólico mayor, que en consecuencia provocaría vulnerabilidad ante condiciones climáticas adversas, como frentes fríos u olas de calor que son cada vez más comunes en Chile y el mundo (Welz & Krellenberg, 2016; Mendes y col., 2020; Aguirre y col., 2022). Por esto es importante tener conocimiento actualizado de las respuestas fisiológicas de insectos vectores de enfermedades, como *T. infestans*, enfermedades que afectan en mayor medida a poblaciones vulnerables (Hope & Thomson, 2008). Los resultados de este estudio pueden ser útiles para evaluar modelos predictivos de distribución geográfica y capacidad vectorial, al igual que las respuestas

fisiológicas en distintas localidades del país en donde esta vinchuca presente focos silvestres activos, con el fin de aplicar programas de prevención efectivos ante este vector tan relevante en la salud pública de Chile y del Cono Sur de Sudamérica.

Conclusiones

- Los resultados evidencian la urgencia de fortalecer las estrategias de control para una eliminación efectiva del vector en áreas habitadas.
- La temperatura crítica máxima de ninfas de estadio V de *T. infestans* estuvo en un rango de $48,95 \pm 1,06^{\circ}\text{C}$ y $49,97 \pm 0,89^{\circ}\text{C}$, con una tendencia a valores más altos en individuos aclimatados a temperaturas más elevadas, aunque no se mostraron diferencias significativas.
- Los rangos temporales de CCRT para las ninfas de *T. infestans* fue de $925,4 \pm 168,3$ segundos hasta $2632,7 \pm 1011,5$ segundos, en donde a mayor temperatura de aclimatación aumentaron significativamente los tiempos de recuperación al frío (CCRT) de *T. infestans*.
- Los resultados destacan la importancia de evaluar las fluctuaciones térmicas en un contexto de cambio climático para insectos vectores de enfermedades como las vinchucas.

Agradecimientos: Al Instituto de Salud Pública, por la entrega de datos, por la

colaboración activa con la vigilancia de insectos de importancia médica. Al laboratorio de Interacciones Ecológicas de la Universidad de Chile por la colaboración en la crianza de ninfas y mantención de colonias. Y Finalmente al Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile por el préstamo de equipo.

Financiamiento:

ANID-ANILLO-ATE230025 y ANID-Programa Becas–Doctorado Becas Chile 2019 72200391

Referencias Bibliográficas

- Angilletta Jr, M.J. (2009). Looking for answers to questions about heat stress: researchers are getting warmer. *Functional Ecology*, 23(2), 231-232.
- Aguirre, G., Undurraga, T., Cotoras, D., & Orellana, T. (2022). El estudio científico del cambio climático en Chile: espacio local y fenómeno global. *Antropologías del Sur*, 9(17), 199-218.
- Alevi, K.C.C., de Oliveira, J., da Silva Rocha, D., & Galvão, C. (2021). Tendencias en la taxonomía de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): de la taxonomía linneana a la integradora. *Pathogens*, 10(12), 1627.

- Bacigalupo, A., Correa, J., García, A., & Cattán, P. (2015). Focos silvestres de *Triatoma infestans* en Latinoamérica: análisis y perspectivas para Chile. *Parasitología Latinoamericana*, 64(3), 27-35.
- Bacigalupo, A., Segura, J.A., García, A., Hidalgo, J., Galuppo, S., & Cattán, P.E. (2006). Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. *Revista Médica de Chile*, 134(10), 1230-1236.
- Belliard, S.A., De la Vega, G.J., & Schilman, P.E. (2019). Thermal tolerance plasticity in Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) and *Triatoma infestans*. *Journal of Medical Entomology*, 56(4), 997-1003.
- Bonacic, C., & Roa, M. (2010). Calera de Tango, reserva de vida. Laboratorio Fauna Australis. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Bozinovic, F., Bastías, D.A., Boher, F., Clavijo-Baquet, S., Estay, S.A., & Angilletta Jr., M.J. (2011). The mean and variance of environmental temperature interact to determine physiological tolerance and fitness. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84(6), 543-552.
- Botto-Mahan, C., Correa, J.P., Bacigalupo, A., Campos-Soto, R., Cattán, P.E., & Solari, A. (2015). Ecología de los triatominos silvestres endémicos de Chile. *Parasitología Latinoamericana*, 64(3), 12-19.
- Bozinovic, F., & Cavieres, L. (2019). La vulnerabilidad de los organismos al cambio climático: rol de la fisiología y la adaptación. Santiago: Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Center of Applied Ecology and Sustainability (CAPES) y Universidad de Concepción Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas. Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB).
- Caminade, C., McIntyre, K.M., & Jones, A.E. (2019). Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1436(1), 157-173.
- Canals, Mauricio, González, Christian, Canals, Lucia, Canals, Andrea, Cáceres, Dante, Alvarado, Sergio, Cattán, Pedro E, Saavedra, Miguel, Zulantay, Inés, & Apt, Werner. (2017). ¿Qué dicen los números de la evolución temporal de la enfermedad de Chagas? -*Revista chilena de infectología*, 34(2), 120-

127.
<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000200004>
- Canals, M., Solis, R., Valderas, J., Ehrenfeld, M., & Cattán, P.E. (1997). Preliminary studies on temperature selection and activity cycles of *Triatoma infestans* and *M. spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), Chilean vectors of Chagas disease. *Journal of Medical Entomology*, 34(1), 11-17.
- Clavijo-Baquet, S., Cavieres, G., González, A., Cattán, P.E., & Bozinovic, F. (2021). Thermal performance of the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, under thermal variability. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(2), e0009148.
- Castañera, M.B., Aparicio, J.P., & Gürtler, R.E. (2003). A stage-structured stochastic model of the population dynamics of *Triatoma infestans*, the main vector of Chagas disease. *Ecological Modelling*, 162(1-2), 33-53.
- Coura, J.R., & Viñas, P.A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(Suppl 7301), S6-S7.
- de la Vega, G.J., & Schilman, P.E. (2018). Ecological and physiological thermal niches to understand distribution of Chagas disease vectors in Latin America. *Medical and Veterinary Entomology*, 32(1), 1-13.
- de la Vega, G.J., Medone, P., Ceccarelli, S., Rabinovich, J., & Schilman, P.E. (2015). Geographical distribution, climatic variability and thermo-tolerance of Chagas disease vectors. *Ecography*, 38(8), 851-860.
- de Sousa, A.S., Vermeij, D., Ramos, A.N., & Luquetti, A.O. (2024). Chagas disease. *The Lancet*, 403(10422), 203-218.
- Gajardo, R. (1995). La vegetación natural de Chile: clasificación y distribución geográfica (p. 165). Santiago, Chile: Editorial Universitaria.
- Garrido, R., Campos-Soto, R., Quiroga, N., & Botto-Mahan, C. (2021). Bloodmeal-stealing in wild-caught *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae), a sylvatic vector of *Trypanosoma cruzi*. *Ecological Entomology*, 46(3), 681-683
- Gibert, P., Moreteau, B., Pétavy, G., Karan, D., & David, J.R. (2001). Chill-coma tolerance, a major climatic adaptation among *Drosophila* species. *Evolution*, 55(5), 1063-1068.
- Guarneri, A., & Lorenzo, M. (Eds.). (2021). *Triatominae-The biology of Chagas disease vectors*. Cham: Springer.
- Hoffmann, A.A., Shirriffs, J., & Scott, M. (2005). Relative importance of

- plastic vs genetic factors in adaptive differentiation: geographical variation for stress resistance in *Drosophila melanogaster* from eastern Australia. *Functional Ecology*, 222-227.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2012). Boletín. Vigilancia para Enfermedad de Chagas 2005-2011: Componente vectorial. Boletín, 2(1), 1-16.
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2014). Norma General Técnica Control y Prevención Nacional de la Enfermedad de Chagas. 10-11
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2018). *Vigilancia de Enfermedad de Chagas 2014-2017: Componente vectorial* (Vol. 8, No. 3). Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 3-14
- IPCC (2023). Sections. In: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, pp. 35- 115. doi: 10.59327/IPCC/AR6-9789291691647
- Jansen, A.M., Xavier, S.C.D.C., & Roque, A.L.R. (2018). Trypanosoma cruzi transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasites & Vectors*, 11, 1-25.
- Kelly-Hope, L., & Thomson, M.C. (2008). Climate and infectious diseases. Seasonal Forecasts, Climatic Change and Human Health: Health and Climate, 31-70
- Lazzari, C.R. (1991). Temperature preference in *Triatoma infestans* (Hemiptera: reduviidae). *Bulletin of Entomological Research*, 81(3), 273-276.
- Lighton, J.R., & Turner, R.J. (2004). Thermolimit respirometry: an objective assessment of critical thermal maxima in two sympatric desert harvester ants, *Pogonomyrmex rugosus* and *P. californicus*. *Journal of Experimental Biology*, 207(11), 1903-1913.
- Lutterschmidt, W.I., & Hutchison, V.H. (1997). The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1553-1560.
- MacMillan, H.A., Williams, C., Staples, J., & Sinclair, B. (2012). Reestablishment of ion homeostasis during chill-coma recovery in the cricket *Gryllus pennsylvanicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

- the United States of America, 109, 20750-20755.
- Martínez-Ibarra, J.A., Martínez-Hernández, F., Grant-Guillén, Y., Villalobos, G., & Noguera-Torres, B. (2023). Vital statistics of the introduced species *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae) in western Mexico under laboratory conditions. *Acta Tropica*, 237, 106728.
- Mendes, F.H., Romero, H., & Ferreira da Silva Filho, D. (2020). Cambio Climático adverso provocado por la urbanización sin planificación ni evaluación ambiental en Santiago de Chile. *Revista de Geografía Norte Grande*, 77, 191-210.
- Merilä, J., & Hendry, A.P. (2014). Cambio climático, adaptación y plasticidad fenotípica: el problema y la evidencia. *Aplicaciones Evolutivas*, 7(1), 1-14.
- Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), 2014. Norma general técnica. Control y prevención nacional de la enfermedad de Chagas.
- Mousseau, T., & Fox, C.W. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution*, 13, 403-407.
- Nattero, J., Leonhard, G., Rodríguez, C.S., & Crocco, L. (2011). Influence of the quality and quantity of blood ingested on reproductive parameters and lifespan in *Triatoma infestans* (Klug). *Acta Tropica*, 119(2-3), 183-187.
- Neven, L.G. (2000). Physiological responses of insects to heat. *Postharvest Biology and Technology*, 21(1), 103-111.
- Overgaard, J., & MacMillan, H.A. (2017). The integrative physiology of insect chill tolerance. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 187-208.
- Paaijamans, K.P., Heinig, R.L., Seliga, R.A., Blanford, J.I., Blanford, S., Murdock, C.C., & Thomas, M.B. (2013). Temperature variation makes ectotherms more sensitive to climate change. *Global Change Biology*, 19(8), 2373-2380.
- Pérez, J., Valdés, A., & Ulloa, J. (2013). Valor biológico, servicios ecosistémicos y plan indicativo de los sitios prioritarios cerros de Lonquén y Chena. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/250/120286>
- Pérez-Molina, J.A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94.
- Pinto, F. (2019). Cambio climático en Chile: Del desafío global a la oportunidad local. Análisis No7/2019, Instituto Igualdad.
- Pörtner, H.O., Bennett, A.F., Bozinovic, F., Clarke, A., Lardies, M.A., Lucassen,

- M., ... & Stillman, J.H. (2006). Trade-offs in thermal adaptation: the need for molecular to ecological integration. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(2), 295-313.
- Rako, L., & Hoffmann, A.A. (2006). Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 52(1), 94-104.
- Rocklöv, J., & Dubrow, R. (2020). Climate change: an enduring challenge for vector-borne disease prevention and control. *Nature Immunology*, 21(5), 479-483.
- Rodrigues, Y.K., & Beldade, P. (2020). Thermal plasticity in insects' response to climate change and to multifactorial environments. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8, 271.
- Rolandi, C., Iglesias, M.S., & Schilman, P.E. (2014). Metabolism and water loss rate of the haematophagous insect *Rhodnius prolixus*: effect of starvation and temperature. *Journal of Experimental Biology*, 217(24), 4414-4422.
- Rupasinghe, R., Chomel, B. B., & Martínez-López, B. (2022). Climate change and zoonoses: A review of the current status, knowledge gaps, and future trends. *Acta Tropica*, 226, 106225.
- San Juan, E., Araya-Donoso, R., Sierra-Rosales, C., Correa, J. P., Quiroga, N., Campos-Soto, R., Solari, A., Llewellyn, M., Bacigalupo, A., & Botto-Mahan, C. (2023). Humans as blood-feeding sources in sylvatic triatomines of Chile unveiled by next-generation sequencing. *Parasites & Vectors*, 16(1), 225.
- Schenone, H., Villarroel, F., Rojas, A., & Alfaro, E. (1980). Biological and ecological factors in the epidemiology of Chagas' disease in Chile. *Boletín Chileno de Parasitología*, 35(3/4), 42-54.
- Schofield, C.J. (1994). *Triatominae: Biología y control*. West Sussex: Euro-communica. Publications.
- Schofield, C.J., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, 22(12), 583-588.
- Shuman, E.K. (2011). Global climate change and infectious diseases. *International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2(1), 11-19.
- Sgró, C.M., Terblanche, J.S., & Hoffmann, A.A. (2016). What can plasticity contribute to insect responses to climate change? *Annual Review of Entomology*, 61(1), 433-451.
- Sinclair, B.J., Marshall, K.E., Sewell, M.A., Levesque, D.L., Willett, C.S., Slotsbo, S., ... & Huey, R.B. (2016).

- Can we predict ectotherm responses to climate change using thermal performance curves and body temperatures? *Ecology Letters*, 19(11), 1372-1385.
- Telleria, J., & Tibayrenc, M. (Eds.). (2017). *American trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research*. Elsevier.
- Terblanche, J.S., Nyamukondiwa, C., & Kleynhans, E. (2010). Thermal variability alters climatic stress resistance and plastic responses in a globally invasive pest, the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 137(3), 304-315.
- Vannier, G. (1994). The thermos biological limits of some freezing intolerant insects: the super cooling and thermos stupor points. *Acta Oecologica*, 15, 31-42.
- Welz, J., & Krellenberg, K. (2016). Vulnerabilidad frente al cambio climático en la Región Metropolitana de Santiago de Chile: posiciones teóricas versus evidencias empíricas. *EURE (Santiago)*, 42(125), 251-272.
- Willmer, P., Stone, G., & Johnston, I. (2009). *Environmental physiology of animals*. John Wiley & Sons.
- World Health Organization (WHO). (2014). *A global brief on vector-borne diseases*.
- World Health Organization (WHO). (2022). *Día Mundial de la Enfermedad de Chagas 2022*.
-

38 – Atenção Primária à Saúde

Avaliação do letramento em saúde e sua relação com variáveis sociodemográficas em pessoas idosas da comunidade

Autor: Lima, Ana Caroline Pinto; E-mail: anacpl@estudante.ufscar.br

Coautor(es): Luchesi, Bruna Moretti; E-mail: bruna.luchesi@ufms.br Maximiano-Barreto,

Madson Alan; E-mail: mmaximianopsi@gmail.com Orientadora: Orlandi, Fabiana de Souza; E. mail: forlandi@ufscar.br

Universidade Federal de São Carlos / Programa de Pós-Graduação em Enfermagem

Resumo

Letramento em saúde é a capacidade que o indivíduo tem de obter, compreender, interpretar e aplicar as informações e orientações relacionadas à saúde. Pessoas idosas tendem a apresentar pior letramento em saúde. Objetivou-se avaliar o letramento em saúde e analisar sua relação com variáveis sociodemográficas em pessoas idosas da comunidade. Estudo transversal e quantitativo, com 200 pessoas idosas cadastradas na Atenção Primária à Saúde (APS) de Naviraí, MS, Brasil. A coleta de dados de caracterização sociodemográfica, utilização dos serviços de saúde e Teste de Letramento em Saúde (TOFHLA) foi de março a junho de 2023. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer nº: 5.921.250). Análise usando o teste T. A maioria da amostra era do sexo masculino (50,5%), entre 60 e 69 anos de idade (51,0%), com mais de quatro anos de escolaridade (55,5%) e com companheiro (51,0%). Identificou-se que 14,0% têm problemas para saber mais sobre sua saúde por dificuldade em compreender informações escritas, 34,5% pedem ajuda de alguém para ler instruções sobre saúde e 27,5% se sentem pouco seguros para preencher formulários sozinho. A média de pontuação no TOFHLA foi 47,7 pontos (escala de 0-100); sendo 72,5% (n=145) com letramento inadequado, 25,0% (n=50) letramento limitado e 2,5% (n=5) letramento adequado. Os participantes com 80+ anos apresentaram pontuação significativamente menor no TOFHLA (média=38,1), quando comparados aos com 60-69 anos (média=50,1, p=0,001) e com 70-79 anos (média=49,7, p=0,003). Conclui-se que o letramento em saúde inadequado é altamente prevalente em pessoas idosas, especialmente nas mais velhas. Os resultados podem subsidiar intervenções por profissionais de saúde da APS, proporcionando maior autonomia na velhice.

Palavras chave: Letramento em Saúde; Idoso; Atenção Primária à Saúde

Introdução

No Brasil, a Estratégia Saúde da Família (ESF) oferece a atenção integral, pensando no contexto de vida de cada sujeito e de suas coletividades, atendendo a uma população adscrita, com foco na continuidade das ações de saúde e na longitudinalidade do cuidado (Brasil, 2017). Vale destacar a discussão acerca da saúde da população idosa e o impacto do seu expressivo aumento, bem como as implicações e desafios para o cotidiano de ações e serviços ofertados na ESF (Santos; Acrani; Lindemann, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) conceitua o letramento em saúde (LS) de um indivíduo como o conhecimento, a confiança e o conforto que as pessoas têm para acessar, entender, avaliar, lembrar e usar informações sobre saúde; tanto para a própria saúde, como para a saúde de outros (WHO, 2022). Esse conhecimento é acumulado ao longo de gerações, mediante interações sociais e atividades do dia-a-dia (WHO, 2022). No entanto, o conceito de LS não é consensual e a adoção de um determinado conceito pode variar de acordo com a área ou de acordo com o que é mais apropriado a cada pesquisador (Peres, Rodrigues; Silva, 2021).

Uma revisão sistemática identificou 17 definições de LS (Sorensen *et al.*, 2012). De forma geral, o LS pode ser definido como as habilidades que os indivíduos vão

adquirindo ao longo da vida, as quais são necessárias para tomar decisões relacionadas à saúde da própria pessoa ou de terceiros (Nutbeam, 2000; IUHPE, 2018). As habilidades podem ser necessárias para obter, compreender, interpretar e aplicar as informações e orientações relacionadas à saúde em diferentes formatos, como em receitas, consultas e serviços, seja de forma escrita, falada ou digital (AMA, 1999; Nielsen-Bohlman *et al.*, 2004; Stocks *et al.*, 2009). Ele se relaciona com o conhecimento individual e com as experiências diárias e pessoais que são acumuladas ao longo da vida e através de gerações (WHO, 2022).

O LS limitado em pessoas idosas é considerado um importante problema de saúde pública (Kobayashi *et al.*, 2016). A ESF é o cenário de saúde que possui o maior contato com os usuários e é onde as pessoas idosas recebem o maior número de informações sobre sua saúde. O LS pode auxiliar os indivíduos a fazerem escolhas saudáveis, terem menos comportamentos de risco e consequentemente mais resultados positivos em saúde (WHO, 2013). Espera-se que as pessoas idosas tenham, portanto, um LS adequado para compreender e aplicar as informações.

A OMS recomenda que a elaboração das políticas públicas leve em consideração as condições de saúde e fatores determinantes econômicos e

culturais que influenciam na saúde da pessoa idosa (WHO, 2005). Considerando que em vários locais do mundo, incluindo o Brasil, as pessoas idosas possuem condições de vida que podem culminar em um LS inadequado; que o mesmo pode estar relacionado à características pessoais específicas (i.e, sexo, idade, escolaridade) e que o baixo LS está associado a altos custos no sistema de saúde (WHO, 2013); a presente pesquisa possui como pergunta norteadora: “Qual a relação entre o letramento em saúde e as variáveis sociodemográficas em pessoas idosas da comunidade?”

Objetivos

Avaliar o letramento em saúde e analisar sua relação com variáveis sociodemográficas em pessoas idosas da comunidade.

Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo de corte transversal, do tipo quantitativo, realizado com pessoas idosas cadastradas nas Unidades de Saúde da Família (USF) no município de Naviraí, Mato Grosso do Sul (MS), Brasil. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CAAE: 65038622.1.0000.0021, parecer nº 5.921.250) e todos os participantes leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre

e Esclarecido em duas vias antes do início das entrevistas.

O município de Naviraí fica localizado no sul do estado de MS e possui uma população de 50.457 habitantes, sendo o sexto município mais populoso do estado. (IBGE, 2022) o município possuía 10 USF que atendiam a uma população correspondente a 76,3% do total do município. O número de pessoas idosas atendidas pelas USF era de 5.738.

A população do estudo foi composta pelas pessoas idosas cadastradas nas USF do município. Para a amostra, foram selecionados os indivíduos que atenderam aos critérios de inclusão: ter idade igual ou superior a 60 anos; ser cadastrado em uma USF do município; ter pelo menos um ano de escolaridade, ou que, mesmo sem ter frequentado a escola, declarasse ter algum conhecimento para leitura (requisito para responder ao instrumento de avaliação do LS). Foram excluídos os participantes que apresentavam algum problema de audição, visão, motor ou de fala não corrigido que impedisse a interação adequada com o entrevistador ou impedisse a conclusão adequada das avaliações propostas. Participantes com diagnóstico de demência não foram abordados, sendo que a informação sobre o diagnóstico foi fornecida pela equipe de saúde.

As entrevistas aconteceram no domicílio dos participantes entre março e junho de 2023, em cinco USF do município,

em sessão única com duração média de 30 minutos.

Os dados coletados foram:

- Dados sociodemográficos: sexo (masculino, feminino), idade (60-69, 70-79 e 80+ anos), estado conjugal (com companheiro, sem companheiro), escolaridade (até 4 anos; mais de 4 anos).

- Utilização dos serviços de saúde: foram feitas as seguintes questões “Com que frequência você tem problemas para saber mais sobre sua saúde por causa da dificuldade em compreender informações escritas?” e “Com que frequência você pede a ajuda de alguém (como um familiar, amigo ou profissional de saúde) para ler instruções sobre saúde?”, com as opções de resposta nunca, ocasionalmente, as vezes, frequentemente e sempre; e “O quanto o(a) senhor(a) se sente seguro para preencher formulários ou fichas sozinho?”, considerando as respostas pouco, muito pouco, mais ou menos, muito e extremamente.

- Letramento em saúde: foi utilizado o Teste de Letramento em Saúde (TLS). O instrumento foi escolhido por ter sido validado em uma amostra que continha pessoas idosas (Maragno *et al.*, 2019) e por ser amplamente utilizado no mundo (Tavousiet *et al.*, 2022). O TLS foi traduzido e validado a partir do *Test of Functional Health Literacy in Adults* (TOFHLA), com 302 pessoas adultas e idosas. A consistência interna na validação foi

considerada satisfatória (coeficiente alfa de Cronbach = 0,95) e similar àquela encontrada no instrumento original (0,98) (Parker *et al.*, 1995). O instrumento é dividido em duas partes, a primeira numérica e a segunda de leitura e compreensão. O TLS numérico contém 17 questões, nas quais é utilizada uma série de cartões pelo entrevistador para que o participante responda questões relacionadas aos dados dos cartões, como prescrições de medicamentos, agendamento de consulta, atestado médico e resultado de exame laboratorial. Na parte de leitura e compreensão, o participante deve completar as questões sozinho. São três trechos, sendo o texto A referente às instruções para o procedimento de radiografia do trato gastrointestinal (16 itens), o texto B relacionado aos direitos do cidadão no Sistema Único de Saúde (20 itens), e o texto C é referente a um termo de consentimento hospitalar (14 itens). Nos textos, palavras são omitidas e o participante deve preencher as lacunas selecionando a alternativa mais apropriada dentre quatro opções. Na parte numérica, a pontuação vai de 0 a 17, e é calculado um escore ponderado que a transforma em uma escala de 0 a 50. Na parte de leitura e compreensão, cada questão vale um ponto, totalizando um escore possível de 0 a 50. O escore final compreende a soma das duas partes e varia de 0 a 100, classificando os indivíduos com letramento inadequado (0-

59 pontos); letramento limitado (60-74 pontos); e letramento adequado em saúde (75-100 pontos) (Maragno *et al.*, 2019).

Os dados coletados foram analisados no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 25.0. Foi feita uma análise univariada descritiva e, em seguida, os dados da média de pontuação de LS entre os grupos de variáveis sociodemográficas foram comparados pelo Teste T. O nível de significância 5% ($p \leq 0,05$) foi adotado para as análises.

Resultados e discussão

Durante o período de coleta de dados, 210 pessoas idosas foram visitadas, sendo que 10 não foram encontradas em casa após duas visitas em períodos alternados e não houve nenhuma recusa ou exclusão, o que resultou na amostra final de 200 pessoas idosas entrevistadas.

A média de pontuação no TOFHLA foi 47,7 pontos (escala de 0-100); sendo 72,5% (n=145) com letramento inadequado, 25,0% (n=50) letramento limitado e 2,5% (n=5) letramento adequado. Identificou-se que 14,0% sempre/frequentemente têm problemas para saber mais sobre sua saúde por dificuldade em compreender informações escritas, 34,5% sempre/frequentemente pedem ajuda de alguém para ler instruções sobre saúde e 27,5% se sentem pouco/muito pouco

seguros para preencher formulários sozinho.

Os participantes com 80 anos ou mais apresentaram pontuação significativamente menor no TOFHLA (média=38,1), quando comparados aos com 60-69 anos (média=50,1, $p=0,001$) e com 70-79 anos (média=49,7, $p=0,003$). A Tabela 1 evidencia os dados de caracterização dos participantes e a comparação das variáveis de acordo com a média de pontuação do LS.

Esse padrão de queda gradual no letramento com o avanço da idade encontra respaldo em estudos clássicos e modernos. Por exemplo, Baker, *et al* (2000) observaram que a pontuação no S-TOFHLA decrescia em aproximadamente 1,3 pontos para cada ano adicional de idade. Isso demonstra que o impacto do envelhecimento no letramento vai além da escolaridade, sendo influenciado também por fatores cognitivos.

Além disso, um estudo recente associou letramento funcional limitado em pessoas idosas com maior risco de fragilidade cognitiva, reforçando que saúde e letramento estão profundamente interligados (Hanipah *et al*, 2024).

Tabela 1- Caracterização sociodemográfica das pessoas idosas participantes (n=200) e comparação das variáveis de acordo com o letramento em saúde. Naviraí, MS, 2023.

Variáveis	n(%)	Letramento em saúde	p-valor*

		Média(dp)	
Sexo			
Masculino	101 (50,5)	46,3 (20,5)	0,282
Feminino	99 (49,5)	49,2 (16,5)	
Idade (anos)			
60-69	102 (51,0)	50,1 (17,9)	60-69 vs 80+: 0,001
70-79	61 (30,5)	49,7 (18,0)	60-69 vs 70-79: 0,891
80+	37 (18,5)	38,1 (17,9)	70-79 vs 80+: 0,003
Estado civil			
Com companheiro	102 (51,0)	50,2 (17,1)	0,058
Sem companheiro	98 (49,0)	45,2 (22,0)	
Escolaridade			
Até 4 anos	89 (44,5)	49,5 (19,7)	0,248
> 4 anos	111 (55,5)	46,4 (17,8)	
Total	200 (100,0)	47,7 (18,7)	-

* Teste T

Os participantes com maior idade apresentaram pior LS. Isso está em consonância pesquisas anteriores que destacam uma associação entre essas variáveis (Aranha *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2024). O envelhecimento pode acarretar declínio de habilidades cognitivas, visuais e auditivas, que influenciam diretamente a capacidade de compreender e aplicar informações em saúde. Além disso, pessoas mais velhas podem ter tido menos acesso à educação formal e menos

oportunidades de contato com tecnologias e materiais informativos contemporâneos, o que reforça a desigualdade de LS entre faixas etárias.

Uma investigação identificou uma associação entre idade avançada, sexo masculino e baixa escolaridade com LS (Romero; Scortegagna; Doring, 2019), sugerindo que fatores sociodemográficos interagem e potencializam o risco de baixo LS. No presente estudo, embora o sexo não tenha apresentado associação estatisticamente significativa, nota-se uma tendência de menores médias entre homens, o que é coerente com a literatura que aponta que mulheres, por utilizarem mais os serviços de saúde e se envolverem mais ativamente no cuidado, tendem a apresentar níveis ligeiramente superiores de LS (Sorensen *et al.*, 2012; Nutbeam, 2000).

Além disso, uma revisão sistemática de Zamora & Clingerman (2011) concluiu que a idade superior a 65 anos está associada a um aumento significativo da prevalência de letramento insuficiente, corroborando o que observamos em nossa amostra.

Esses resultados indicam a importância de estratégias educacionais direcionadas para abordar as necessidades específicas desses subgrupos, considerando as possíveis barreiras associadas à idade.

Sabe-se que pessoas idosas com

melhor letramento em saúde apresentam menor comprometimento funcional (Roth, *et al* 2008), indicando que as estratégias educacionais podem ter impacto não apenas na compreensão da informação de saúde, mas também na preservação da funcionalidade em idades mais avançadas.

Um estudo entre adultos com mais de 75 anos demonstrou que o letramento está fortemente associado às habilidades de autocuidado (self-management), independentemente da escolaridade, o que sugere que intervenções focadas no letramento podem melhorar resultados em qualquer estrato educacional (Geboers, *et al* 2016).

Mais do que isso, um estudo com pacientes com insuficiência cardíaca mostrou que o letramento em saúde mediatiza a relação entre idade e desfechos clínicos, reduzindo em 41% o risco associado à idade evidência de que letramento pode atenuar o impacto adverso do envelhecimento em contextos crônicos (Wu, *et al* 2016).

Em linha com isso, estudos anglo-saxões mostram que idosos com letramento limitado têm menor uso de serviços preventivos e maior hospitalização, além de pior qualidade de vida (Wolf, Gazmararian, & Baker, 2005), e uma revisão brasileira relaciona letramento funcional com adesão medicamentosa, fator chave para a saúde em idosos com múltiplas comorbidades.

A presente investigação possui

limitações que precisam ser consideradas. Trata-se de um estudo transversal em que não é possível identificar relação de causalidade entre as variáveis. Os dados representam uma pequena amostra de um único município e não podem ser generalizados. Destaca-se, ainda, a impossibilidade de realizar a pesquisa com pessoas idosas de todas as USF do município por determinação da gestão como outra limitação. Ainda assim, os achados oferecem subsídios relevantes para políticas locais e indicam a necessidade de novas pesquisas longitudinais e multicêntricas para aprofundar a compreensão da relação entre idade, LS e desfechos de saúde. Estudos longitudinais, como o de Baker, *et al* (2000), reforçam a importância de acompanhar a evolução do LS com o envelhecimento.

Conclusão

O letramento em saúde (LS) inadequado é altamente prevalente em pessoas idosas, especialmente nas mais velhas. Os resultados podem subsidiar intervenções por profissionais de saúde da APS, proporcionando maior autonomia na velhice. Sugere-se, ainda, que os profissionais de saúde e gestores se apropriem da temática do LS, visto que é um determinante da saúde, e que possam avaliar este constructo entre as pessoas idosas. A partir disso devem ser elaboradas estratégias e políticas públicas para

influenciar no LS e consequentemente reduzir a probabilidade de óbito e melhorar a qualidade de vida dessa população. Afinal, ainda que letramento em saúde seja produto da capacidade das pessoas, ele também é influenciado pela capacidade de resposta do sistema de saúde. Especificamente na enfermagem, pode-se pensar em desenvolver melhores estratégias para empoderar as pessoas idosas para a promoção do autocuidado, ressaltando importância do estímulo ao LS por enfermeiros em diferentes serviços na rede de atenção à saúde.

Referências Bibliográficas

- Ad Hoc Committee on Health Literacy for the Council on Scientific Affairs, American Medical Association. (1999). Health literacy: Report of the council on scientific affairs. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 281(6), 552–557. <https://doi.org/10.1001/jama.281.6.552>
- Aranha, A., Patel, P., Panaich, S., & Cardozo, L. (2015). Health literacy and cardiovascular disease risk factors among the elderly: a study from a patient-centered medical home. *The American Journal of Managed Care*, 21(2), 140–145.
- Baker, D. W., Gazmararian, J. A., Sudano, J., & Patterson, M. (2000). The association between age and health literacy among elderly persons. *The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences*, 55(6), S368-74. <https://doi.org/10.1093/geronb/55.6.s368>
- Brasil. (2017, setembro 21). Portaria nº 2.436, de 21 de setembro de 2017: Aprova a Política Nacional de Atenção Básica, estabelecendo a revisão de diretrizes para a organização da Atenção Básica no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-2.436-de-21-de-setembro-de-2017-174222852>
- Cabral, J. F., Da Silva, J. F. G., Gleriano, J. S., Balderrama, P., Borges, A. P., & Da Silva, A. M. C. (2019). Avaliação da atenção integral à saúde do idoso na percepção de profissionais. *Revista brasileira em promoção da saúde*, 32. <https://doi.org/10.5020/18061230.2019.8367>
- Geboers, B., de Winter, A. F., Spoorenberg, S. L. W., Wynia, K., & Reijneveld, S. A. (2016). The association between health literacy and self-management abilities in adults aged 75 and older, and its moderators. *Quality of Life*

- Research: An International Journal of Quality of Life Aspects of Treatment, Care and Rehabilitation*, 25(11), 2869–2877.
<https://doi.org/10.1007/s11136-016-1298-2>
- Giannelli, S. V., Patel, K. V., Windham, B. G., Pizzarelli, F., Ferrucci, L., & Guralnik, J. M. (2007). Magnitude of underascertainment of impaired kidney function in older adults with normal serum creatinine. *Journal of the American Geriatrics Society*, 55(6), 816–823.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2007.01196.x>
- Mohammad Hanipah, J., Mat Ludin, A. F., Singh, D. K. A., Subramaniam, P., & Shahar, S. (2024). Limited health literacy increases the likelihood of cognitive frailty among older adults. *BMC Geriatrics*, 24(1), 840.
<https://doi.org/10.1186/s12877-024-05419-x>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2022). Tábuas completas de mortalidade em ano de pandemia de COVID-19.
<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca/catalogo?view=detalhes&id=2101981>
- International Union for Health Promotion and Education. (2018). Position statement on health literacy: A practical vision for a health literate world. IUHPE Global Working Group on Health Literacy.
http://www.iuhpe.org/images/IUHPE/Advocacy/IUHPEHealth_Literacy_2018.pdf
- Kobayashi, L. C., Wardle, J., Wolf, M. S., & von Wagner, C. (2016). Aging and functional health literacy: A systematic review and meta-analysis. *The Journals of Gerontology. Series B, Psychological Sciences and Social Sciences*, 71(3), 445–457.
<https://doi.org/10.1093/geronb/gbu161>
- Lenart, P., Kuruczova, D., Joshi, P. K., & Bienertová-Vašků, J. (2019). Male mortality rates mirror mortality rates of older females. *Scientific Reports*, 9(1), 10589.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47111-w>
- Lima, A. C. P., Maximiano-Barreto, M. A., Martins, T. C. R., & Luchesi, B. M. (2024). Factors associated with poor health literacy in older adults: A systematic review. *Geriatric Nursing (New York, N.Y.)*, 55, 242–254.
<https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2023.11.016>
- Lima, J. P. de, Abreu, D. P. G., Bandeira, E. D. O., Brum, A. N., Mello, M. C. V. A.

- de, Varela, V. D. S., & Martins, N. F. F. (2019). LETRAMENTO FUNCIONAL EM SAÚDE E FATORES ASSOCIADOS EM PESSOAS IDOSAS. *Cogitare Enfermagem*, 24. <https://doi.org/10.5380/ce.v24i0.63964>
- Lindquist, L. A., Go, L., Fleisher, J., Jain, N., Friesema, E., & Baker, D. W. (2012). Relationship of health literacy to intentional and unintentional non-adherence of hospital discharge medications. *Journal of General Internal Medicine*, 27(2), 173–178. <https://doi.org/10.1007/s11606-011-1886-3>
- Maragno, C. A. D., Mengue, S. S., Moraes, C. G., Rebelo, M. V. D., Guimarães, A. M. de M., & Pizzol, T. da S. D. (2019). Teste de letramento em saúde em português para adultos. *Revista brasileira de epidemiologia [Brazilian journal of epidemiology]*, 22(0), e190025. <https://doi.org/10.1590/1980-549720190025>
- Nielsen-Bohlman, L., Panzer, A. M., & Kindig, D. A. (2004). Health literacy: A prescription to end confusion. National Academies Press.
- Nutbeam, D. (2000). Health literacy as a public health goal: a challenge for contemporary health education and communication strategies into the 21st century. *Health promotion international*, 15(3), 259–267. <https://doi.org/10.1093/heapro/15.3.259>
- Parker, R. M., Baker, D. W., Williams, M. V., & Nurss, J. R. (1995). The test of functional health literacy in adults: a new instrument for measuring patients' literacy skills. *Journal of General Internal Medicine*, 10(10), 537–541. <https://doi.org/10.1007/bf02640361>
- Peres, F., Rodrigues, K. M., & Silva, T. L. (2021). Literacia em saúde. Editora Fiocruz.
- Romero, S. S., Scortegagna, H. de M., & Doring, M. (2018). NÍVEL DE LETRAMENTO FUNCIONAL EM SAÚDE E COMPORTAMENTO EM SAÚDE DE IDOSOS. *Texto & contexto enfermagem*, 27(4). <https://doi.org/10.1590/0104-07072018005230017>
- Roth, M. T., Moore, C. G., Ivey, J. L., Esserman, D. A., Campbell, W. H., & Weinberger, M. (2008). The quality of medication use in older adults: methods of a longitudinal study. *The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy*, 6(4), 220–233. <https://doi.org/10.1016/j.amjopharm.2008.10.004>

- Escobar dos Santos, L., Olszanski Acrani, G., & Loraine Lindemann, I. (2020). QUALIDADE DE VIDA DE IDOSOS ASSISTIDOS NA ATENÇÃO BÁSICA. *Revista Espaço Ciência & Saúde*, 8(1), 19–33. <https://doi.org/10.33053/recs.v8i1.256>
- Sørensen, K., Van den Broucke, S., Fullam, J., Doyle, G., Pelikan, J., Slonska, Z., Brand, H., & (HLS-EU) Consortium Health Literacy Project European. (2012). Health literacy and public health: a systematic review and integration of definitions and models. *BMC Public Health*, 12(1), 80. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-80>
- Stocks, N. P., et al. (2009). Health literacy: A new concept for general practice? *Australian Family Physician*, 38(3), 144–146.
- Tavousi, M., Mohammadi, S., Sadighi, J., Zarei, F., Kermani, R. M., Rostami, R., & Montazeri, A. (2022). Measuring health literacy: A systematic review and bibliometric analysis of instruments from 1993 to 2021. *PLoS One*, 17(7), e0271524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271524>
- Wolf, M. S., Gazmararian, J. A., & Baker, D. W. (2005). Health literacy and functional health status among older adults. *Archives of Internal Medicine*, 165(17), 1946–1952. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.17.1946>
- World Health Organization. (2005). Envelhecimento ativo: Uma política de saúde (S. Gontijo, Trad.). Organização Pan-Americana da Saúde.
- World Health Organization. (2013). Health literacy: The solid facts. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326432/9789289000154-eng.pdf>
- Health literacy development for the prevention and control of noncommunicable diseases: Volume 1. Overview. (2022, novembro 6). Who.int; World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240055339>
- Wu, J.-R., Moser, D. K., DeWalt, D. A., Rayens, M. K., & Dracup, K. (2016). Health literacy mediates the relationship between age and health outcomes in patients with heart failure. *Circulation. Heart Failure*, 9(1), e002250. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002250>
- Zamora, H., & Clingerman, E. M. (2011). Health literacy among older adults: a

systematic literature review. *Journal of Gerontological Nursing*, 37(10), 41–51. <https://doi.org/10.3928/00989134-20110503-02>

Financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001" - "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Agradecimentos

A Secretaria Geral de Relações Internacionais (SRInter) e a Pró-reitoria de Pós-Graduação (ProPG) da UFSCar.

37-Agroalimentos

Evaluación del contenido de lípidos peroxidados en plántulas de soja (*Glycine max*) inducidas por la exposición de semillas a radiación UV-C

Autora: Ramel, Carolina Mailén; E. mail: carolina.ramel@uner.edu.ar

Orientadores: Sequín, Christian J; E. mail: christian.sequin@uner.edu.ar; Appelhans, Stefania C; E. mail: stefania.appelhans@uner.edu.ar; Gegenschatz, Sofía A; E. mail: sofia.gegenschatz@uner.edu.ar; Bianchi, Mariana; E. mail: mariana.bianchi@uner.edu.ar; Schutt, Lorena S; E. mail: schutt.lorena@inta.gob.ar.

Facultad de Ciencias Agropecuarias – Universidad Nacional de Entre Ríos (FCA-UNER)

Resumen

La radiación ultravioleta tipo C (UV-C) es una herramienta emergente para inducir respuestas fisiológicas en plantas mediante estrés oxidativo controlado. Este trabajo evaluó el contenido de lípidos peroxidados en plántulas de soja (*Glycine max*) provenientes de semillas expuestas a diferentes dosis de UV-C. Las semillas fueron irradiadas durante 10 o 15 minutos a 20 o 50 cm de distancia y sembradas en condiciones controladas. A los 14 días, se extrajeron cotiledones y se analizó la peroxidación lipídica mediante el método FOX, cuantificando equivalentes de H₂O₂ por masa de muestra. Los tratamientos con mayor dosis (15 min a 20 cm) mostraron los niveles más altos de peroxidación, mientras que los de menor intensidad evidenciaron efectos moderados.

Estos resultados sugieren que la aplicación de UV-C en semillas puede modular el metabolismo oxidativo en etapas tempranas del desarrollo, representando una estrategia bioestimulante potencial para mejorar el rendimiento y la resiliencia de cultivos.

Palabras clave: lípidos peroxidados, soja, UV-C.

Introducción

La exposición de la soja (*Glycine max*) a radiación UV-C ha despertado un creciente interés debido a su potencial impacto sobre la germinación, el desarrollo vegetal y las respuestas antioxidantes. Investigaciones recientes abordan tanto los efectos fisiológicos como los mecanismos moleculares que se desencadenan ante este tipo de radiación (Pournavab, et. al. 2019).

La aplicación exógena de radiación ultravioleta tipo C (UV-C) genera un incremento significativo en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), entre las cuales se destacan el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH). Estas moléculas cumplen un doble rol en el metabolismo vegetal: por un lado, actúan como señales clave en procesos de defensa, crecimiento y desarrollo; por otro, cuando su concentración supera ciertos umbrales, generan un desbalance redox que conduce a estrés oxidativo (Apel & Hirt, 2004).

En este contexto, la acumulación excesiva de ROS puede desencadenar daños estructurales y funcionales a nivel celular, incluyendo la peroxidación lipídica de membranas, la oxidación de proteínas y ácidos nucleicos, y la alteración de rutas metabólicas esenciales. Particularmente, el H_2O_2 y el O_2^- han sido identificados como actores centrales en la modulación del

desarrollo radicular y en la activación de mecanismos de defensa frente a distintos estresores abióticos (Dunand et al., 2007; Lv et al., 2017).

La capacidad de la planta para contrarrestar los efectos nocivos del estrés oxidativo depende de la eficiencia de su sistema antioxidante, tanto enzimático (como las superóxido dismutasas, catalasas y peroxidasas) como no enzimático (compuestos fenólicos, glutatión, entre otros). En ausencia o insuficiencia de estos mecanismos, las ROS se acumulan y ejercen efectos citotóxicos que comprometen la viabilidad celular y la integridad funcional de los tejidos. La determinación de los niveles de peróxidos constituye así un indicador clave del estado redox de la célula y de la intensidad del daño oxidativo (Saadet Dermiş et al., 2012).

Esta investigación plantea la hipótesis de que la aplicación de radiación UV-C a semillas de soja induce cambios en el balance redox de las plántulas, el cual podría evidenciarse mediante cambios en la concentración de lípidos peroxidados en las plántulas.

La incorporación de tecnologías físicas no convencionales en la agricultura, como la radiación ultravioleta tipo C (UV-C), abre nuevas posibilidades para modular procesos fisiológicos en las plantas de soja. Esta modulación puede ofrecer múltiples beneficios, entre ellos una mayor inducción

de defensas, lo que contribuye al mejor control de enfermedades. En este marco, la aplicación dirigida de UV-C a semillas podría ser una estrategia para activar mecanismos claves para el crecimiento inicial. Esta línea de trabajo busca alternativas sostenibles que contribuyan a disminuir el uso de fitosanitarios en los agroecosistemas.

Objetivo

Evaluar el contenido de lípidos peroxidados en plántulas de soja (*Glycine max*) inducidas por la exposición de semillas a radiación UV-C.

Materiales y métodos

La presencia de lípidos peroxidados se determinó mediante el método FOX (oxidación ferrosa con naranja de xilenol), siguiendo el protocolo descrito por Dermiş, S. et al. (2012). Este método se basa en la medición de la absorbancia a 650 nm de los complejos coloreados formados entre iones $^{+}$ férricos (Fe^{3+}) y naranja de xilenol, luego de la oxidación de $^{+}$ iones ferrosos (Fe^{2+}) en presencia de peróxidos. Utilizando una curva estándar para la estimación matemática de la cantidad de peróxidos presentes en extractos.

Para los extractos, se utilizaron cotiledones de plántulas de soja (*Glycine max*) cultivadas bajo diferentes tratamientos.

Las semillas fueron previamente desinfectadas con etanol al 70% y una

solución de hipoclorito de sodio ($NaClO$ al 1%, 55 g/L) durante 30 segundos, seguidos de tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego, se dejaron secar en condiciones estériles, próximas a la llama de un mechero.

Se diseñaron cinco tratamientos, cada uno con seis repeticiones, utilizando recipientes individuales con 120 g de suelo, tres semillas y 30 mL de agua destilada para cada una de ellas (Figura 1). Los tratamientos se diferenciaron por el tiempo y la distancia de exposición a radiación UV-C (260 nm):

- **Control (C):** sin exposición a radiación UV-C.
- **10 UV-C 20:** exposición durante 10 minutos a 20 cm de distancia.
- **15 UV-C 20:** exposición durante 15 minutos a 20 cm de distancia.
- **10 UV-C 50:** exposición durante 10 minutos a 50 cm de distancia.
- **15 UV-C 50:** exposición durante 15 minutos a 50 cm de distancia.

Tabla 1. Tratamientos con UV-C

		Dosis bajas		Dosis altas	
Tratamientos	Control	15 UV-C 50	10 UV-C 50	15 UV-C 20	10 UV-C 20
Tiempo y distancia	–	15 min - 50 cm	10 min - 50 cm	15 min - 20 cm	10 min - 20 cm
Dosis	0 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$	1674 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$	1116 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$	6507 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$	4338 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$

Luego fueron mantenidas en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas:

25 °C, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, durante aproximadamente 14 días.

Para el análisis de peroxidación lipídica, se utilizaron 0,15 g de cotiledones secos por repetición. Los tejidos fueron macerados y extraídos con una mezcla cloroformo:metanol (7:3 v/v). Tras centrifugación, el sobrenadante se dividió en dos alícuotas: a una se le añadió una solución de sulfato ferroso ⁺ (Fe²⁺) disuelto en ácido sulfúrico (0,5 M) y a la otra, ácido sulfúrico (0,5 M) sin sulfato ferroso (Fe²⁺), la cual constituyó el blanco de muestra. Además se realizó un blanco de reactivo. Finalmente, se incorporó naranja de xilenol

(10mM), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, para luego medir la absorbancia a 650 nm utilizando un espectrofotómetro (Figura 2). Se realizó una curva con Fe⁺³. Los resultados fueron expresados como equivalentes químicos de H₂O₂/Kg muestra. En cada ensayo el diseño de los tratamientos fue completamente aleatorizado. Los datos se analizaron mediante ANOVA y se utilizó el software Jamovi (Navarro and Foxcroft, 2019).



Figura 1. Plántulas emergidas luego del tratamiento con UV-C

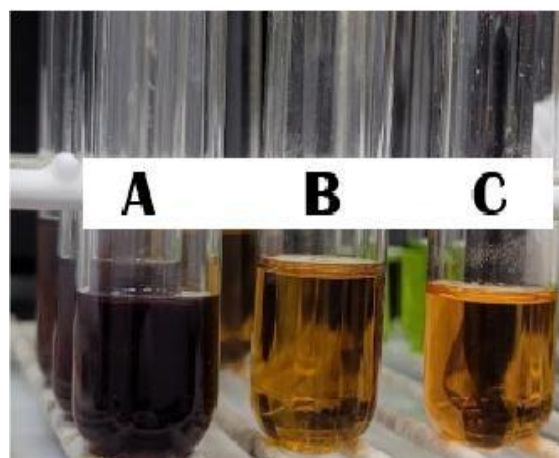


Figura 2. A) Muestra con reactivos, B) Blanco de la muestra, C) Blanco de reactivo.

Resultados

Tabla 2. Resultado del ANOVA de un Factor según Welch (asumiendo varianzas no iguales)

	F	gl1	gl2	p
Equivalente químico H_2O_2 /kg muestra	3.65	4	4,73	0.100

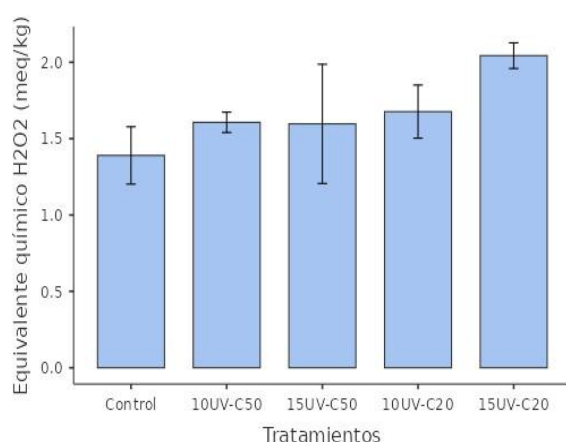


Figura 3. Equivalente químico de H_2O_2 por masa de muestra (meq/kg)

Si bien el análisis no arrojó diferencias estadísticamente significativas bajo el umbral convencional ($p < 0.05$), el valor de $p = 0.100$ sugiere una tendencia marginalmente significativa, particularmente relevante en estudios exploratorios. Este resultado respalda la hipótesis de que la radiación UV-C aplicada a semillas podría inducir una respuesta oxidativa diferenciada entre tratamientos.

Discusión

La exposición de las semillas de soja a radiación UV-C provocó un aumento en los niveles de lípidos

peroxidados en las plántulas, en comparación con el control no irradiado. Este efecto fue dependiente tanto del tiempo de exposición como de la distancia a la fuente de radiación.

Los tratamientos 10 UV-C 20 y 15 UV-C 20, con irradiación a 20 cm, mostraron los mayores valores de peroxidación lipídica, indicando un estrés oxidativo inducido por la radiación. En particular, el tratamiento 15 UV-C 20 presentó los niveles más elevados, lo que sugiere una relación directa entre el tiempo de exposición y la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto, está en línea con lo reportado por Apel & Hirt (2004), quienes destacan que la acumulación excesiva de ROS puede generar daño oxidativo en los tejidos, afectando la integridad de las membranas celulares.

Por otro lado, los tratamientos realizados a mayor distancia (10 UV-C 50 y 15 UV-C 50) mostraron valores de peroxidación más moderados. En estos casos, la menor intensidad de radiación debido al incremento en la distancia habría atenuado la generación de ROS. Sin embargo, incluso estos niveles subóptimos de exposición parecieron ser suficientes para inducir respuestas oxidativas detectables.

Estas observaciones sugieren que la aplicación de UV-C en semilla actúa como un agente abiótico inductivo, capaz de

modificar el estado redox del tejido vegetal, generando respuestas adaptativas. La aplicación controlada de este tipo de estrés podría ser una herramienta para modular respuestas fisiológicas en etapas tempranas del desarrollo vegetal, como han señalado otros autores (Dunand et al., 2007; Lv et al., 2017).

A pesar de los beneficios potenciales de la inducción de mecanismos de defensa, una exposición excesiva, como en el tratamiento 15 UV-C 20, podría resultar contraproducente, generando un nivel de daño que supere la capacidad antioxidante del sistema celular. Esto refuerza la importancia de establecer un umbral óptimo de exposición, que maximicen la activación de defensas sin comprometer la viabilidad de los tejidos.

Conclusión

La exposición de semillas de soja a radiación UV-C indujo una respuesta oxidativa detectable en las plántulas, evidenciada por el aumento en los niveles de lípidos peroxidados.. Esto sugiere que la aplicación de UV-C modula el metabolismo redox en etapas tempranas del desarrollo, y podría emplearse como estrategia bioestimulante para inducir defensas naturales en cultivos, contribuyendo a prácticas agrícolas más sostenibles. Sin embargo, será necesario ajustar dosis e intensidades para evitar

efectos negativos sobre la viabilidad celular.

Bibliografía

- Lv, W., Yang, L., Xu, C., Shi, Z., Shao, J., Xian, M., & Chen, J. (2017). Cadmium disrupts the balance between hydrogen peroxide and superoxide radical by regulating endogenous hydrogen sulfide in the root tip of Brassica rapa. *Frontiers in Plant Science*, 8, 232.
- Dunand, C., Crèvecoeur, M., & Penel, C. (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol.* 174, 332–341.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399.
- Saadet Dermiş, Seda Can & Bilgehan Doğru (2012): Determination of Peroxide Values of Some Fixed Oils by Using the mFOX Method, *Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication*, 45:5, 359-363
- Pournavab, R., Mejía, E., Mendoza, A., Cruz, L., & Heya, M. (2019). Ultraviolet Radiation Effect on Seed Germination and Seedling Growth of Common Species from Northeastern Mexico. *Agronomy*.

<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY90606>

Navarro, D.J., Foxcroft, D.R., (2019).
Learning statistics with jamovi: A
tutorial for psychology students and

other beginners (Version 0.70).

Available online:

<http://learnstatswithjamovi.com>

29. Matemática Aplicada

ALGORITMOS DE APRENDIZAJE AUTOMÁTICA PARA MEJORAR LA EFICIENCIA EN LA PREDICCIÓN GENÓMICA EN MAÍZ Y TRIGO

Autor: Filipigh, Sebastián¹; *E-mail:* sebastian.filipigh@mi.unc.edu.ar

Co-autora: Iglesias, Juliana³; *E-mail:* iglesias.juliana@inta.gob.ar; Rueda Calderón, María Angélica⁴; *E-mail:* maria.rueda.c@pucv.cl

Orientadora: Bruno, Cecilia^{1,2}; *E-mail:* cebruno@agro.unc.edu.ar

¹ Cátedra de Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC; ² Grupo de Estadística y Biometría vinculado a la Unidad de Fitopatología y Modelización Agrícola (UFyMA), INTA-CONICET; ³ INTA Pergamino – UNNOBA; ⁴ Instituto de Acuicultura de los Llanos IALL. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.

Resumen

La predicción genómica permite estimar características fenotípicas en individuos no evaluados. Este trabajo comparó el desempeño de modelos de aprendizaje automático (ML) y modelos lineales mixtos (MM) en trigo y maíz. Se utilizaron datos del CIMMYT para rendimiento (599 líneas de trigo con 11.447 marcadores DArT) y del INTA Pergamino severidad frente a *Fusarium graminearum* (63 líneas de maíz con chip SNPs de 56K). Se ajustaron tres modelos ML: Random Forest (RF), Gradient Boosting Machine (GBM), Support Vector Machines (SVM) y tres MM con efecto aleatorio de genotipo y diferentes matrices de relación: de pedigrí (A), genómica (G) y combinadas (H). La validación cruzada incluyó correlación (r) y error cuadrático medio de predicción (RMSE). En trigo, los MM con matrices combinadas (H) superaron a los modelos que usaron una sola matriz. En ML, SVM tuvo mejor capacidad de generalización sobre G y G_{ch} . En maíz, A mostró mejor poder predictivo en MM, mientras que SVM también fue el algoritmo más robusto entre los modelos ML. RF y GBM evidenciaron sobreajuste. Se concluye que el uso de matrices combinadas y el algoritmo SVM permiten optimizar la predicción genómica en ambos cultivos, remarcando la importancia de una adecuada elección metodológica.

Palabras clave: Matrices de relación genética, modelos de inteligencia artificial, capacidad predictiva.

Introducción

La predicción genómica ha emergido como una herramienta fundamental para el mejoramiento genético vegetal. Esta estrategia permite seleccionar individuos de alto valor genético en etapas tempranas, acelerando los ciclos de selección y optimizando el uso de recursos (Meuwissen et al., 2001; Crossa et al., 2017). Sin embargo, su eficacia depende en gran medida de la precisión con que se estimen las relaciones genéticas entre individuos y caracteres fenotípicos.

Tradicionalmente, estas correlaciones se estimaban a partir de pedigríes mediante modelos lineales mixtos. Sin embargo, actualmente se dispone de datos moleculares que permiten construir matrices genómicas (G), que son mucho más representativas de la relación genética real entre individuos. Además, se ha propuesto integrar la información genómica y de pedigrí a través de matrices unificadas (H). Este enfoque, que utiliza metodologías como las de Christensen et al. (2012), Martini et al. (2018), o promedios ponderados (Legarra et al., 2009), podría mejorar sustancialmente la capacidad predictiva de los modelos.

Paralelamente, el desarrollo de algoritmos de aprendizaje automático (Machine learning, ML) ha abierto nuevas oportunidades en la predicción genómica y

en el estudio de la arquitectura genética de caracteres complejos. En particular, técnicas como redes neuronales convolucionales (CNN) han revolucionado el análisis de imágenes en aplicaciones agrícolas, permitiendo la detección precisa y temprana de enfermedades mediante el procesamiento automatizado de imágenes foliares. Estas redes superan a métodos tradicionales de clasificación como árboles de decisión o k-NN, gracias a su capacidad para extraer características espaciales profundas directamente desde las imágenes (Gulmez, 2024).

El uso de CNN y otras técnicas de IA en agricultura permite diagnosticar enfermedades como el tizón de la hoja del maíz, roya común y mancha gris, con alta precisión, facilitando la implementación práctica por parte de los agricultores mediante aplicaciones móviles y sistemas automatizados. Este tipo de soluciones han mostrado ser más confiables, rápidos y sostenibles al reducir el uso de pesticidas, contribuyendo también a la mitigación del impacto ambiental (Gulmez, 2024).

Además, el uso de técnicas ML como Random Forest (RF), Gradient Boosting Machine (GBM), Support Vector Machines (SVM) y redes neuronales profundas se ha posicionado como alternativa robusta para predecir valores genéticos a partir de matrices genómicas. Estos algoritmos son

eficaces en contextos de alta dimensionalidad, capaces de modelar relaciones no lineales y detectar interacciones complejas entre marcadores (Heslot et al., 2012; Montesinos- López et al., 2018).

En este contexto, los modelos multirrasgo (multi-trait) representan una estrategia valiosa, al modelar varios caracteres simultáneamente, capturando sus correlaciones genéticas subyacentes. Esto permite mejorar la eficiencia y robustez de las predicciones, especialmente útil cuando los caracteres evaluados presentan relaciones biológicas y funcionales (Jia & Jannink, 2012; Montesinos-López et al., 2016).

Este trabajo busca evaluar modelos estadísticos que combinan técnicas de aprendizaje automático y modelos lineales mixtos, en cuanto a su capacidad para mejorar la predicción genómica. Se trabajó con dos cultivos estratégicos: trigo, a través del análisis del rendimiento de grano en múltiples mega ambientes; y maíz, a partir de la severidad de fusariosis causada por *Fusarium graminearum*. Los datos se procesan mediante modelos lineales mixtos y algoritmos de machine learning, comparando su desempeño en la predicción genómica. Los resultados no solo permiten mejorar la predicción del rendimiento o la resistencia, sino también

avanzar hacia sistemas integrados para el diagnóstico y la selección temprana de genotipos. Estos aportes metodológicos buscan fortalecer los programas de mejoramiento genético vegetal con herramientas modernas, precisas y escalables.

Objetivo general

Evaluar modelos estadísticos que integran algoritmos de aprendizaje automático en cuanto a su capacidad para mejorar la predicción genómica en relación a modelos lineales mixtos.

Objetivos específicos

- * Comparar la precisión y consistencia de métodos de estimación de correlaciones genéticas basados en matrices de pedigrí A, matrices genómicas G y matrices combinadas H, aplicadas a datos de maíz y trigo.

- *Aplicar modelos de aprendizaje automático para caracterizar la estructura genética poblacional y modelar la relación entre variables fenotípicas y genotípicas en líneas endocriadas.

- *Evaluar el desempeño predictivo de modelos multirrasgo enriquecidos con técnicas de ML, mediante métricas como r , RMSE, para la predicción de la respuesta en ambos cultivos.

Materiales y Métodos

A continuación se detallan las dos bases de datos, una correspondiente a trigo y otra a maíz. Base de datos de trigo: La base de datos utilizada fue provista por el Programa Global de Mejoramiento de Trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, México). Contiene información de 599 líneas de trigo genotipadas mediante 11.447 marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados por diversidad (DArT), desarrollados por Triticarte Pty. Ltd. (Canberra, Australia) y disponibles a través de Diversity Arrays Technology (<https://www.diversityarrays.com>). Se eliminaron los marcadores con una frecuencia alélica menor al 5 %, y los datos faltantes se imputaron utilizando un modelo de Bernoulli, donde la probabilidad de presencia del alelo correspondía a su frecuencia observada. Luego del control de calidad, se conservaron 1.279 marcadores informativos para los análisis. El rasgo fenotípico analizado fue el rendimiento promedio de grano (GY), registrado para cada genotipo en cuatro mega ambientes definidos por el CIMMYT. Además, se dispuso de información de pedigrí abarcando múltiples generaciones, lo que permitió construir la matriz de relaciones genealógicas A mediante la plataforma ICIS Browse (McLaren et al., 2000; McLaren et al., 2005). Esta matriz permitió

reflejar tanto la historia de selección como los niveles de consanguinidad entre los genotipos evaluados.

Base de datos de maíz: Proveniente del Grupo de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino, Buenos Aires, Argentina, esta base contiene información genotípica y fenotípica de 63 líneas endocriadas de maíz. La genotipificación se realizó mediante un chip de 56K SNPs, y la evaluación fenotípica se centró en la severidad de la infección por *Fusarium graminearum* causante de la fusariosis de la espiga. La severidad fue clasificada mediante una escala ordinal propuesta por Reid et al. (1996), basada en el porcentaje de área afectada en la espiga, con categorías que van de 1 (sin síntomas) a 7 (76–100 % de la espiga afectada). Durante el pre procesamiento de los datos genotípicos, se aplicaron criterios de calidad que resultaron en la eliminación de 331 SNPs con más del 20 % de datos faltantes, 6.710 SNPs monomórficos o sin posición cromosómica (ubicados en scaffolds), y 5.756 SNPs con una frecuencia de alelo menor (MAF) al 5 %. En total, se eliminaron 14.524 SNPs. Sin embargo, gracias al alineamiento múltiple contra la versión v5 del genoma de referencia B73, se logró recuperar información posicional de aproximadamente 3.000 SNPs

previamente asignados a scaffolds, pero que ahora se ubican en cromosomas correctamente ensamblados. El número final de SNPs con el que se realizaron los análisis fue de 41.586.

Construcción de matrices genómicas y combinadas

Se explica la construcción de matrices de relación genómica G y la integración del pedigrí a través de matrices combinadas H . A partir de los datos genotípicos normalizados, se construyó la matriz genómica G siguiendo el método propuesto por VanRaden (2008). Para ambas bases se extrajo la submatriz $A22$ correspondiente, derivada de la matriz de pedigrí A . A partir de estas matrices, se desarrollaron tres estrategias para construir una matriz combinada H , que integra información genealógica y genómica, con el fin de mejorar la precisión en la estimación de parámetros genéticos y la predicción de valores genéticos.

El método de Christensen et al. (2012) busca compatibilizar las escalas de las matrices G y $A22$, para evitar que una fuente de información predomine sobre la otra. Se aplicaron los siguientes pasos: Se extrajo la submatriz $A22$, correspondiente a los individuos genotipados. Se escaló la matriz

genómica G para obtener G_{esc} , igualando su traza y media a las de $A22$. Se combinó G_{esc} con $A22$ mediante una media ponderada: $G_{\text{ch}} = \beta \cdot G_{\text{esc}} + (1 - \beta) \cdot A22$, donde $\beta = 0,7$ representa la ponderación asignada a la matriz genómica. La matriz resultante G_{ch} reemplazó a $A22$ en la matriz A , dando lugar a la matriz combinada H . Por otra parte, el método de Martini et al. (2018), modifica únicamente la submatriz $A22$ de la matriz completa A , incorporando información genómica a través de una corrección ponderada. La matriz combinada se define como:

$H = A + \omega(G - A22)$, donde $\omega = 0,5$ representa el grado de ajuste de $A22$ hacia G . De este modo, los elementos de A correspondientes a individuos no genotipados se mantienen inalterados, mientras que la relación entre genotipados se actualiza hacia la matriz genómica.

En cuanto a el promedio ponderado directo entre G y $A22$ la submatriz $A22$ se reemplaza por una combinación convexa directa con la matriz genómica G , definida como:

$H_{\text{weighted}} = w \cdot G + (1-w) \cdot A22$, donde $w = 0,6$ es la ponderación asignada a la matriz genómica.

La matriz H_{weighted} resultante se

inserta en lugar de A22 dentro de la matriz genealógica A, generando así una matriz combinada final H.

Modelos ajustados

Se ajustaron modelos lineales mixtos de la forma:

$y = X\beta + Zu + \epsilon$, donde $u \sim N(0, K\sigma^2)$ y $\epsilon \sim N(0, I\sigma^2)$. Se emplearon tres variantes: basada en marcadores

$u \in (m \sim N(0, G\sigma^2))$, en pedigrí ($a \sim N(0, A\sigma^2)$) y combinada ($y = 1\mu + m + a + \epsilon$). Los ML ajustados fueron: Random Forest (RF), Gradient Boosting Machines (GBM) y Support Vector Machines (SVM). RF es un modelo de ensamblado basado en múltiples árboles construidos sobre subconjuntos aleatorios; se evaluaron diferentes valores del hiperparámetro $mtry$, que indica el número de variables seleccionadas aleatoriamente en cada partición del árbol. GBM es un modelo secuencial que ajusta árboles débilmente predictivos de manera aditiva, y se exploraron combinaciones de los hiperparámetros $interaction.depth$ (profundidad máxima de cada árbol), $n.trees$ (número total de árboles), $shrinkage$ (tasa de aprendizaje) y $n.minobsinnode$ (número mínimo de

observaciones en los nodos terminales). SVM con kernel radial busca hiperplanos óptimos en espacios transformados mediante funciones kernel; se ajustaron los hiperparámetros σ (parámetro del kernel radial) y C (parámetro de penalización por error).

Las métricas utilizadas fueron: Coeficiente de correlación (r) y Raíz cuadrada del error cuadrático medio (RMSE). El procesamiento de datos, ajuste de modelos y visualización se realizó en R (v4.3.1) empleando los paquetes `groupdata2`, `ggplot2`, `randomForest`, `caret` y `doParallel` para computación paralela. Los datos se dividieron en conjuntos de entrenamiento y prueba (70 % en entrenamiento y 30 % de prueba) mediante `createDataPartition()`, fijando una semilla para garantizar la reproducibilidad. Para los ML se definieron grillas de hiperparámetros y se utilizó validación cruzada de 10 pliegues (`trainControl(method = "cv", number = 10)`). Los modelos se ajustaron con la función `train()` del paquete `caret`. La evaluación de los modelos se complementó con una función personalizada `graficar modelo()` que genera gráficos de dispersión

observados vs. predichos para ambos conjuntos, permitiendo visualizar el ajuste y la capacidad de generalización que utiliza la librería ggplot2.

Resultados

Se evaluó el desempeño predictivo de diversos modelos lineales mixtos utilizando diferentes matrices de relación genética en la base de datos de trigo.

Inicialmente, se ajustó un MM utilizando la matriz A se observó $r=0,34$, un error cuadrático medio (RMSE) de 0,89, un error absoluto medio (MAE) de 0,72 y un coeficiente de determinación $R^2=0,11$. Por su parte, el modelo basado en la G logró una mejora moderada respecto al anterior, con una correlación de 0,41, un RMSE de 0,87, MAE de 0,69 y $R^2=0,15$, lo que indica una mejor capacidad para capturar la variabilidad genética aditiva. La combinación de ambas matrices en el modelo A + G mejoró levemente el desempeño predictivo, con una correlación de 0,44, RMSE de 0,86, MAE de 0,68 y $R^2=0,17$, sugiriendo que la integración de ambas fuentes de información puede complementar las limitaciones de cada una por separado. Se evaluaron además tres enfoques alternativos de combinación de matrices: el método de trazas ajustadas propuesto

por Christensen et al. (2012), el modelo H Martini de Martini et al. (2018), y un promedio ponderado directo entre A22 y G, denominado Hweighted. El modelo de Christensen mostró el mejor desempeño dentro de este grupo, con una correlación de 0,44, RMSE de 0,86, MAE de 0,68 y $R^2=0,18$, superando ligeramente al modelo A + G. El modelo H Martini obtuvo valores similares, con $R^2=0,18$ y una correlación de 0,43. En contraste, el modelo Hweighted no presentó mejora alguna con respecto al modelo basado exclusivamente en la matriz A, manteniendo los mismos valores de desempeño (Ver La Tabla 1). Estos resultados indican que las combinaciones basadas en ajuste de escala (Christensen) o estrategias alternativas de combinación (Martini) pueden mejorar marginalmente la predicción, mientras que la simple combinación ponderada no siempre garantiza un mejor ajuste. La elección de la estrategia de fusión de información genética debe, por tanto, considerar tanto la calidad como la complementariedad de las fuentes involucradas.

Tabla 1: Comparación del desempeño predictivo entre diferentes modelos de relación.

Modelo	Correlación	RMSE	MAE	R^2
A	0,3356	0,8909	0,7214	0,1065
G	0,4128	0,8701	0,6906	0,1477
A+G	0,4354	0,8587	0,6799	0,1699
G.Christensen	0,4384	0,8555	0,6790	0,1761
H.Martini	0,4324	0,8537	0,6827	0,1796
H.weighted	0,3356	0,8909	0,7214	0,1065

La Figura 1 muestra las relaciones entre los valores observados y predichos para cada modelo. En general, se observa que la dispersión alrededor de la identidad (línea 1:1) se reduce al incorporar matrices genómicas, y que los valores extremos son mejor capturados por los modelos que integran información de G.

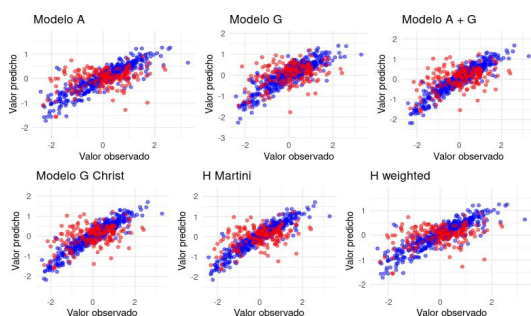


Figura 1: Relación entre valores observados y predichos bajo distintos modelos.

Posteriormente, se evaluó el desempeño predictivo de los ML, empleando como variables explicativas exclusivamente los marcadores genómicos contenidos en la matriz G. El Cuadro 2 presenta los resultados de correlación y error cuadrático medio (RMSE) obtenidos durante el entrenamiento y la prueba de los tres ML obteniéndose en la fase de entrenamiento, el modelo RF mostró el mejor ajuste con

una correlación de 0,98 y el menor RMSE (0,34), lo que indica una alta capacidad para capturar la variabilidad de los datos durante el aprendizaje. GBM también presentó un buen ajuste con una correlación de 0,93 y un RMSE de 0,44, mientras que SVM obtuvo el peor desempeño en entrenamiento (correlación de 0,88 y RMSE de 0,52). Sin embargo, los resultados en el conjunto de prueba muestran una caída en el rendimiento de todos los modelos, evidenciando posibles signos de sobreajuste (overfitting), especialmente en el caso de RF, cuya correlación disminuyó a 0,55. Pese a ello, SVM alcanzó la mayor correlación en prueba 0,57, superando levemente a los otros dos algoritmos, y además logró el menor RMSE en prueba 0,82, lo que sugiere una mejor capacidad de generalización para datos no vistos.

Tabla 2: Desempeño predictivo de los modelos de aprendizaje automático utilizando la matriz genómica G.

Modelo	Correlación (Train)	RMSE (Train)	Correlación (Test)	RMSE (Test)
Random Forest	0,98	0,34	0,55	0,83
SVM	0,88	0,52	0,57	0,82
GBM	0,93	0,44	0,55	0,83

En la Figura 2, se ilustran las gráficas de dispersión entre valores observados y predichos para los tres modelos. Se evidencia que el modelo SVM, a pesar de presentar un menor ajuste en el conjunto de entrenamiento ($r=0,88$), logra una mayor capacidad de generalización sobre

el conjunto de prueba ($r=0,57$; $RMSE=0,82$). Por el contrario, tanto RF como GBM muestran correlaciones muy altas en entrenamiento (0,98 y 0,93, respectivamente), pero con un desempeño reducido en la fase de prueba, lo que sugiere la presencia de sobreajuste.



Figura 2: Relación entre valores observados y predichos para los modelos RF, SVM y GBM utilizando la matriz G. La línea discontinua indica la identidad (1:1). Posteriormente se ajustaron los tres modelos ML sobre un conjunto de entrenamiento derivado de la matriz de parentesco A. Los gráficos de dispersión de valores observados versus predichos (Figura 3) muestran que, si bien los tres modelos presentan un buen ajuste sobre el conjunto de entrenamiento, sus rendimientos en el conjunto de prueba son notablemente inferiores, lo que sugiere también un grado considerable de sobreajuste.



Figura 3: Relación entre valores observados y predichos por modelo (RF, SVM y GBM) usando la matriz A.

Las métricas detalladas en la Tabla 3 respaldan el análisis del desempeño predictivo de los modelos. El modelo RF alcanzó la mayor correlación en el conjunto de entrenamiento ($r=0,93$) y el menor error cuadrático medio ($RMSE=0,43$). Asimismo, mostró un rendimiento aceptable en el conjunto de prueba, con una correlación de 0,58 y un RMSE de 0,81, siendo el modelo con mejor capacidad de generalización dentro de este grupo. Por su parte, el modelo GBM también mostró buen ajuste en el entrenamiento ($r=0,89$, $RMSE=0,49$), y replicó el rendimiento de RF en el conjunto de prueba ($r=0,58$; $RMSE=0,81$). En cambio, el modelo SVM evidenció un ajuste más débil en el entrenamiento ($r=0,71$; $RMSE=0,72$) y presentó una menor capacidad predictiva en prueba ($r=0,46$; $RMSE=0,88$).

Tabla 3: Rendimiento predictivo de modelos ajustados con la matriz genealógica A.

Modelo	Correlación Train	Correlación Test	RMSE Train	RMSE Test
Random Forest	0,93	0,58	0,43	0,81
SVM	0,71	0,46	0,72	0,88
GBM	0,89	0,58	0,49	0,81

Estos resultados sugieren que la matriz de parentesco A proporciona una fuente de información útil para la predicción, aunque con limitaciones. Si bien los modelos logran capturar estructura en los datos de entrenamiento, la capacidad de generalización sigue siendo moderada,

posiblemente debido a la menor precisión que ofrecen las matrices de pedigrí frente a alternativas basadas en marcadores genómicos.

Posteriormente, se ajustaron los mismos modelos predictivos utilizando la matriz Gch, generada según el procedimiento propuesto por Christensen et al. (2012). Este enfoque busca compatibilizar las escalas entre las matrices G y A22, evitando que una fuente de información predomine sobre la otra en la construcción de la matriz de relación combinada H.

La matriz resultante Gch reemplazó a A22 en la conformación de H, que fue utilizada para ajustar los ML. Las métricas de rendimiento obtenidas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Rendimiento predictivo de modelos ajustados utilizando la matriz genómica escalada Gch.

Modelo	Correlación Train	Correlación Test	RMSE Train	RMSE Test
Random Forest	0,978	0,586	0,336	0,821
SVM	0,994	0,610	0,108	0,792
GBM	0,951	0,590	0,359	0,828

Los modelos usando ésta matriz muestran una mejora general en la correlación de prueba respecto al ajuste con la matriz genealógica. El modelo SVM presentó la mejor correlación en test ($r=0,610$), acompañado por un $RMSE=0,792$, lo que sugiere una mejor generalización. Aunque RF y GBM también mejoraron sus métricas de validación, el modelo GBM aún muestra cierta tendencia al sobre ajuste, como lo

evidencia la diferencia entre los errores de entrenamiento y prueba. Los resultados apoyan el uso de la matriz Gch como una alternativa viable para integrar información genómica de manera balanceada, favoreciendo una mejora en la capacidad predictiva de los modelos, especialmente en contextos donde se dispone de información parcial de pedigrí y genotipos.

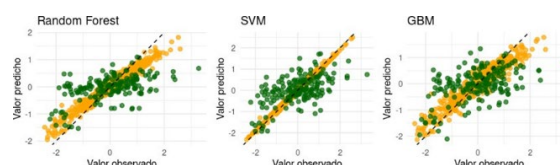


Figura 4: Comparación entre valores observados y predichos utilizando modelos ajustados con la matriz Gch. Con la matriz combinada construida bajo el enfoque de Martini, se repitió el procedimiento de ajuste de modelos predictivos utilizando la matriz denominada Hma, generada a partir de la integración de información genealógica y genómica, este enfoque buscó capturar de manera más precisa la estructura poblacional al combinar ambas fuentes de información.

Tabla 5: Rendimiento predictivo de modelos ajustados con la matriz combinada Hma.

Modelo	Correlación Train	Correlación Test	RMSE Train	RMSE Test
Random Forest	0,978	0,539	0,336	0,852
SVM	0,974	0,562	0,231	0,833
GBM	0,983	0,557	0,217	0,837

En cuanto al desempeño predictivo utilizando la matriz combinada Hma (Martini), (ver Tabla 5) el modelo SVM alcanzó la mayor correlación en el conjunto de prueba $r=0,562$ y un $RMSE$ de 0,833, lo que sugiere una buena capacidad de generalización. El modelo GBM presentó un rendimiento similar, con una correlación en prueba de $r=0,557$ y un $RMSE$ de 0,837, mostrando

también una elevada correlación en el conjunto de entrenamiento $r = 0,983$, lo que podría indicar un leve sobre ajuste. Por su parte, el modelo RF obtuvo una correlación de prueba ligeramente inferior $r=0,539$ y un RMSE de 0,852, ubicándose en un rendimiento intermedio. El uso de la matriz Hma permite alcanzar buenos niveles de predicción, particularmente con modelos como SVM y GBM. Sin embargo, la diferencia entre los valores de entrenamiento y prueba sigue revelando indicios de sobre ajuste, lo que enfatiza la importancia de ajustar y validar cuidadosamente los modelos.

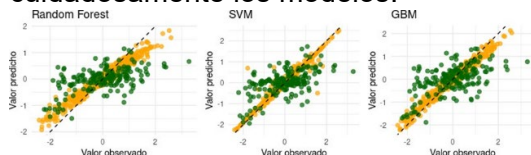


Figura 5: Comparación del rendimiento predictivo de los modelos utilizando la matriz combinada Hma.

Por último, se construyó la matriz Hw a partir de un promedio ponderado directo entre la matriz genómica G y la submatriz genealógica A22, definida como: $H \text{ weighted} = w \cdot G + (1 - w) \cdot A22$, donde se utilizó un valor de ponderación $w = 0,6$, asignando mayor peso a la información genómica.

Con la matriz Hw se entrenaron los tres modelos de ML y los resultados obtenidos presentados en la Tabla 6 muestran un desempeño competitivo en la capacidad de predicción de los modelos ajustados utilizando dicha matriz, en comparación con matrices genómicas o genealógicas por separado. El SVM obtuvo el mejor rendimiento en el conjunto de prueba, con una correlación de $r=0,605$ y el menor RMSE en test 0,852, lo que sugiere una adecuada capacidad para capturar patrones complejos relevantes en los datos. El GBM también evidenció un buen desempeño, con una

correlación de prueba de 0,585 y un RMSE de 0,869. No obstante, mostro un marcado sobreajuste, reflejado en su muy bajo RMSE en entrenamiento 0,209 y alta correlación en train de 0,984. Por su parte, el modelo RF mantuvo resultados competitivos, con una correlación test de 0,592 y un RMSE test de 0,883, apenas superior al de los otros modelos.

Tabla 6: Rendimiento predictivo de modelos ajustados con la matriz combinada H weighted.

Modelo	Correlación Train	Correlación Test	RMSE Train	RMSE Test
Random Forest	0,979	0,592	0,332	0,883
SVM	0,921	0,605	0,395	0,852
GBM	0,984	0,585	0,209	0,869

En conjunto, estos resultados resaltan el potencial del promedio ponderado directo como estrategia integradora de información genealógica y genómica. A pesar de su simplicidad, la matriz Hw logró mejorar la estabilidad predictiva, especialmente en modelos como SVM y GBM, lo que la posiciona como una alternativa robusta en escenarios con múltiples fuentes de relación.



Figura 6: Relación entre valores observados y predichos en los modelos ajustados con la matriz H weighted.

Modelos ajustados para Maiz

Para los datos maíz se utilizaron datos fenotípicos de severidad de Fusarium graminearum y genotípicos SNP provistos por el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del INTA Pergamino. A partir de esta información, se ajustaron los mismos modelos lineales mixtos que en trigo con

distintas matrices de relación genética con el objetivo de predecir la severidad de la enfermedad. También se utilizaron matrices de parentesco A, genómicas G, combinaciones H. La severidad fue considerada como variable respuesta continua. Los siguientes resultados se obtuvieron usando como fenotipo la severidad de *Fusarium graminearum*.

Tabla 7: Métricas de desempeño predictivo para distintos modelos lineales mixtos con matrices de relación genética.

Modelo	Correlación	RMSE	MAE	R ²
A	0,435	0,935	0,728	0,0168
G	0,231	0,942	0,733	0,0027
A+G	0,435	0,935	0,728	0,0168
G_Christensen	0,311	0,940	0,732	0,0068
H_Martini	0,346	0,939	0,731	0,0092
H_Weighted	0,326	0,940	0,731	0,0078

En la Tabla 7 se observa que los modelos que incorporan la matriz A (ya sea sola o combinada con G) presentan mejor desempeño en términos de correlación entre valores observados y predichos, así como menores valores de RMSE y MAE. Esto indica que, para este conjunto de datos, la información proveniente del pedigrí posee mayor poder predictivo que la información genómica por sí sola. No obstante, los modelos H, que integran ambas fuentes de información mediante distintas estrategias de combinación, también muestran resultados competitivos,

aunque con ligeras pérdidas de precisión respecto a la matriz A.

También se ajustaron los ML con el objetivo de predecir la severidad de la enfermedad. Los resultados que se presentan a continuación corresponden a la predicción de la severidad de *Fusarium graminearum* utilizando únicamente la matriz genotípica G como fuente de información.

Tabla 8: Métricas de desempeño de los modelos para la predicción de severidad de *Fusarium graminearum*.

Modelo	Correlación Train	Correlación Test	RMSE Train	RMSE Test
Random Forest	0,9728938	0,04620186	0,4051645	0,9598625
SVM	0,6226124	0,33531507	0,8086575	0,9312365
GBM	0,6802990	0,15601356	0,7792231	0,9342986

Los resultados obtenidos en Tabla 8 muestran diferencias marcadas en la capacidad predictiva de los modelos evaluados. El modelo de RF presentó un alto ajuste sobre los datos de entrenamiento, con una correlación de 0,97 y un RMSE de 0,41. Sin embargo, su desempeño en los datos de testeo fue notablemente bajo, con una correlación de tan solo 0,05 y un RMSE cercano a 0,96, lo cual indica un sobreajuste considerable. Por otro lado, el modelo SVM mostró una menor correlación en entrenamiento 0,62, pero una mejor generalización en test ($r=0,34$), acompañado de un RMSE más bajo que los otros modelos de 0,93, lo cual sugiere un mejor equilibrio entre ajuste y capacidad predictiva. El modelo GBM se comportó de forma intermedia, con una

correlación en entrenamiento de 0,68 y en test de 0,16, mostrando también señales de sobreajuste, aunque menos pronunciadas que en RF. En general, los resultados reflejan la dificultad de predecir la severidad de *Fusarium graminearum* en este conjunto de datos exclusivamente a partir de la información genotípica G, y resaltan la importancia de una adecuada validación para evitar la selección de modelos con alto sobreajuste.

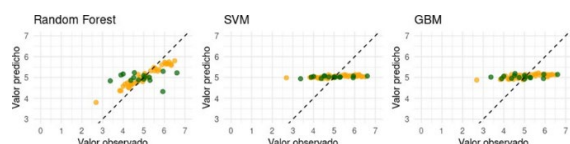


Figura 7: relación entre valores observados y predichos por modelo (RF, SVM y GBM) usando la matriz G.

Posteriormente, se presentan los resultados que corresponden a la predicción de la severidad de *Fusarium graminearum* utilizando únicamente la matriz A como fuente de información.

Tabla 9: Métricas de desempeño de los modelos para la predicción de severidad de *Fusarium graminearum* usando la matriz A.

Modelo	Correlación Train	Correlación Test	RMSE Train	RMSE Test
Random Forest	0,9404876	0,07360443	0,4343893	0,9545879
SVM	0,3481146	0,56821118	0,8243870	0,8981866
GBM	0,7606309	0,28291968	0,7651955	0,9271976

Los resultados presentados en la Tabla 9 evidencian contrastes relevantes en el desempeño de los modelos cuando se utiliza la matriz de parentesco A como fuente de información genotípica. El modelo RF mostró una alta correlación en

los datos de entrenamiento 0,94 y un RMSE bajo de 0,43, pero su capacidad de generalización fue limitada, reflejada en una baja correlación en test de 0,07 y un RMSE alto de 0,95, lo que sugiere sobreajuste. Por el contrario, el modelo SVM, a pesar de tener la correlación más baja en entrenamiento 0,35, alcanzó la mayor correlación en test 0,57 y el menor RMSE en testeo 0,90, lo cual indica un buen equilibrio entre ajuste y generalización. El modelo GBM presentó una correlación intermedia en entrenamiento 0,76 y un desempeño moderado en testeo ($r=0,28$ y RMSE de 0,93), mostrando también signos de sobreajuste aunque en menor medida que RF. En conjunto, los resultados indican que el modelo SVM logró el mejor desempeño predictivo con la matriz A, resaltando la necesidad de evaluar cuidadosamente el comportamiento de los modelos en validación para evitar conclusiones erróneas basadas solo en el ajuste del entrenamiento.

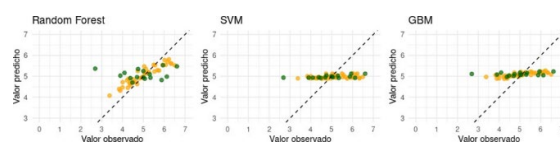


Figura 8: relación entre valores observados y predichos por modelo (RF, SVM y GBM) usando la matriz A.

En la Tabla 10 se presentan las métricas de rendimiento obtenidas para los modelos

ajustados utilizando la matriz G de Christensen. El modelo RF presentó una alta correlación en el conjunto de entrenamiento 0,95, pero un desempeño deficiente en el conjunto de prueba, con una correlación de 0,19, lo que indica un sobreajuste. El modelo SVM mostró una correlación más baja en el entrenamiento 0,55, pero una mejor capacidad predictiva en el conjunto de prueba 0,39, con errores similares en ambos conjuntos. Por su parte, el modelo GBM logró una correlación alta en el entrenamiento 0,83, aunque con una baja correlación en la prueba 0,35, indicando una capacidad de generalización limitada. Estos resultados sugieren que, si bien algunos modelos se ajustan bien a los datos de entrenamiento, su capacidad de predicción fuera de muestra es limitada bajo la estructura de relaciones definida por la matriz G de Christensen.

Tabla 10: Métricas de rendimiento de los modelos ajustados utilizando la matriz G de Christensen.

Modelo	Correlación Train	Correlación Test	RMSE Train	RMSE Test
Random Forest	0,9517	0,1932	0,4431	0,8655
SVM	0,5457	0,3946	0,8300	0,8489
GBM	0,8349	0,3479	0,7561	0,8419

En la Figura 9 se observa que la dispersión de los puntos en el gráfico del modelo RF es alta en el conjunto de prueba, sin una tendencia clara a seguir la línea diagonal (línea 1:1), lo que visualmente confirma el sobreajuste. El gráfico de GBM presenta una dispersión mayor, lo cual es

consistente con su menor rendimiento en la fase de prueba en comparación con SVM.

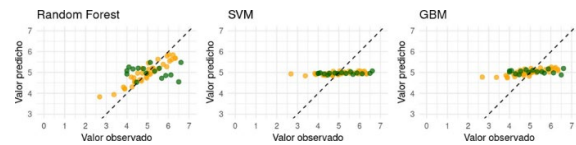


Figura 9: relación entre valores observados y predichos por modelo (RF, SVM y GBM) usando la matriz Gch.

En la Tabla 11 se resumen las métricas de rendimiento obtenidas al ajustar los modelos utilizando la matriz H de Martini. En este caso, el modelo RF nuevamente mostró una alta correlación en el conjunto de entrenamiento 0.95, pero una capacidad predictiva baja en el conjunto de prueba 0,15, lo cual evidencia cierto sobreajuste. Por el contrario, el modelo SVM, a pesar de tener una menor correlación en el entrenamiento 0,46, alcanzó la mayor correlación en el conjunto de prueba 0,40, con un error relativamente bajo, indicando una mejor capacidad de generalización. El modelo GBM también presentó un buen equilibrio, con correlaciones de 0,79 y 0,38 en entrenamiento y prueba respectivamente, y errores comparables.

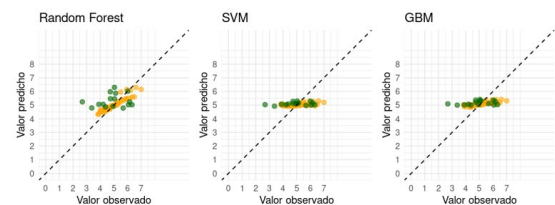


Figura 10: relación entre valores observados y predichos por modelo (RF, SVM y GBM) usando la matriz Gma.

cual se refleja en su menor correlación y mayor error.

Conclusiones

Los MM en trigo demostraron que el modelo basado únicamente en la matriz A mostró una correlación de 0,34, mientras que el modelo que usó la matriz G alcanzó una correlación de 0,41. La combinación de (A+G) mejoró marginalmente el desempeño, llegando a una correlación de 0,44 y un coeficiente de determinación R^2 de 0,17. Estrategias más sofisticadas, como la propuesta por Christensen et al., lograron el mejor r (0,44) y el mayor R^2 de 0,18, superando ligeramente a la combinación simple A+G. Esto demuestra que la manera en que se fusionan los datos genéticos es crucial para optimizar el rendimiento predictivo. Posteriormente, se evaluaron algoritmos de aprendizaje automático, que revelaron su potencial y sus limitaciones. Al utilizar la matriz genómica G, el modelo SVM mostró la mejor capacidad de generalización, alcanzando una correlación de 0,57 y un RMSE de 0,82 en el conjunto de prueba, superando a Random Forest ($r=0,55$, RMSE=0,83) y GBM (correlación 0,55, RMSE de 0,83). La marcada diferencia entre las métricas de entrenamiento (por ejemplo, la correlación de 0,98 de Random Forest) y prueba indicó un problema de

sobreajuste, que fue menos pronunciado en el caso de SVM.

Para la predicción de la severidad de *Fusarium graminearum* en maíz, el MM que empleó únicamente la matriz A mostró la mayor capacidad predictiva, con una correlación de 0,435, superando significativamente al modelo que utilizó solo la matriz genómica G, que alcanzó una correlación de 0,231. La combinación de ambas matrices (A+G) no mejoró el rendimiento del modelo A, manteniendo una correlación de 0,435. Estos hallazgos sugieren que, para este conjunto de datos, la información de pedigrí capturó mejor la variabilidad genética relevante para la resistencia a las enfermedades. El uso de ML presentó resultados mixtos y resaltó el problema del sobreajuste. Cuando se usó la matriz G para predecir la severidad de *Fusarium graminearum*, los modelos RF y GBM mostraron correlaciones muy altas en el entrenamiento (0,97 y 0,68, respectivamente), pero un desempeño muy bajo en la prueba (correlaciones de 0,05 y 0,16, evidenciando un sobreajuste severo. En contraste, el modelo SVM mostró una correlación más moderada en el entrenamiento (0,62) pero una capacidad de generalización superior en la prueba, alcanzando una correlación de 0,34. Al utilizar la matriz A en los ML, se observó un patrón similar. El modelo SVM

logró la mejor correlación en la prueba (0,57) y el menor RMSE (0,90), a pesar de tener una correlación baja en el entrenamiento (0,35).

Este resultado lo posicionó como el algoritmo más equilibrado y robusto en términos de generalización. Por último, la integración de diferentes matrices de relación en ML se demostró como una estrategia muy efectiva para mejorar la precisión y generalización. En el caso del trigo, el modelo SVM alcanzó su mejor rendimiento con la matriz genómica escalada (Gch), logrando una correlación de 0,610, una mejora significativa en comparación con el uso de la matriz genómica G. De forma similar, en el maíz, aunque la información de pedigrí resultó ser un predictor más fuerte, una combinación optimizada de matrices de Martini permitió que el RF superara a los demás, con una alta correlación de 0,65. Estos hallazgos confirman que los ML, especialmente SVM y RF, ofrecen una capacidad predictiva superior cuando se aplican con una estrategia adecuada de fusión de matrices, lo que enfatiza la importancia de una selección cuidadosa tanto de la fuente de datos como del algoritmo de predicción para lograr resultados robustos en el mejoramiento genético.

Referencias

- [1] Barreto, C. A. V., et al. (2024). Sci Rep, 14, 1062. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51792-3>
- [2] Breiman, L. (2001). Random forests. Machine Learning, 45(1), 5–32.
- [3] Christensen, O. F., Madsen, P., Nielsen, B., Ostersen, T., & Su, G. (2012). Single-step methods for genomic evaluation in pigs. J. Anim. Sci., 90(12), 4365–4372. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4603>
- [4] Cortes, C., & Vapnik, V. (1995). Support-vector networks. Machine Learning, 20(3), 273–297.
- [5] Crossa, J., Pe´rez-Rodríguez, P., Cuevas, J., Montesinos-Lo´pez, O., Jarquín, D., de los Campos, G., & Singh, R. (2017). Genomic selection in plant breeding: methods, models, and perspectives. Trends Plant Sci., 22(11), 961–975. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.011>
- [6] Elshire, R. J., et al. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLOS ONE, 6(5), e19379.
- [7] Friedman, J. H. (2001). Greedy function approximation: a gradient boosting machine. Ann. Stat., 29(5), 1189–1232.
- [8] Ganai, M. W., et al. (2011). A large maize SNP genotyping array: development

and germ- plasm genotyping. *BMC Genomics*, 12, 555.

[9] González-Camacho, J. M., et al. (2018). Applications of machine learning to genomic se- lection in wheat. *Plant Genome*, 11(2), 170104.

[10] Gulmez, B. (2024). Advancements in maize disease detection: A comprehensive review of convolutional neural networks. *Computers in Biology and Medicine*, 183, 109222. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2024.109222>

[11] Heslot, N., Yang, H.-P., Sorrells, M. E., & Jannink, J.-L. (2012). Genomic selection in plant breeding: a comparison of models. *Crop Sci.*, 52(1), 146–160. <https://doi.org/10.2135/cropsci2011.06.0299>

[12] Jia, Y., & Jannink, J.-L. (2012). Multiple-trait genomic selection methods. *Genetics*, 192(4), 1513–1522.

[13] Kuhn, M. (2008). Building predictive models in R using the caret package. *J. Stat. Softw.*, 28(5), 1–26.

[14] Legarra, A., Aguilar, I., & Misztal, I. (2009). A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.*, 92(9), 4656–4663.

[15] Liaw, A., & Wiener, M. (2002). Classification and regression by randomForest. *R News*, 2(3), 18–22.

[16] Martini, J. W. R., et al. (2018). A single-step procedure correcting for stratification. *Genet.*

Sel. Evol., 50(1), 40.

[17] Meuwissen, T. H. E., Hayes, B. J., & Goddard, M. E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide marker maps. *Genetics*, 157(4), 1819–1829.

[18] Montesinos-Lo´pez, O. A., et al. (2016). A genomic Bayesian multi-trait and multi- environment model. *G3*, 6(9), 2725–2744.

[19] Montesinos-Lo´pez, O. A., et al. (2018). Multivariate Bayesian shrinkage models. *G3*, 8(12), 3829–3842.

[20] Munkvold, G. P. (2003). Epidemiology of Fusarium diseases and mycotoxins in maize ears.

Eur. J. Plant Pathol., 109, 705–713.

[21] Reid, L. M., Hamilton, R. I., & Mather, D. E. (1996). Screening maize for resistance to Gibberella ear rot. *Agric. Agri- Food Canada, Publ.* 1996–03.

[22] Romay, M. C., et al. (2013). Comprehensive genotyping of the US maize inbred seed bank. *Genome Biol.*, 14(6), R55.

[23] Torres, O. A., et al. (2014). Urinary fumonisin B1 and intake in women in Guatemala. *Mol. Nutr. Food Res.*, 58(5), 973–983.

-
- [24] VanRaden, P. M. (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4414–4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>
- [25] Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer, New York.
- [26] Weston, S., & Revolution Analytics. (2015). *doParallel: Foreach Parallel Adaptor for the 'parallel' Package*. R package version 1.0.10.

37.- Agroalimentos

MUTACIÓN Y TOXICIDAD DE CELULAS VEGETALES EN DIVISIÓN CELULAR POR EFECTO DEL LÁTEX DE OCHOÓ (*Hura crepitans*)

Autor: Divico, Guelvid; guelviddivicocom8@gmail.com

Co-autor(es): Gutierrez, Melany; mgutierrez41@umsa.bo

Orientador/a: Rodrigo, Gloria; grodrigo@fcpn.edu.bo

Universidad Mayor de San Andrés / Facultad de Agronomía, Programa de Ingeniería Forestal y Maderera.

Resumen

En la región de Palos Blancos Alto Beni se encuentra una especie forestal ochoó (*Hura crepitans*) de uso para construcción, medicinal y en agricultura. El principal problema para hacer el aprovechamiento de esta especie forestal es el látex que emana al momento de cortar su corteza debido a que es altamente tóxico para la piel y los ojos el principal objetivo de esta investigación es evaluar la mutación y toxicidad. Se desarrollo el estudio en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Puras el mes de marzo, 2022 y una segunda replica de estudio se realizó en el laboratorio de la Estacion Experimental Sapecho en abril, 2023. Se recolecto el látex de (*Hura crepitans*), del Municipio de Palos Blancos Posteriormente, se hizo el corte de forma transversal en las puntas de las raíces de los cebollines con una dimensión de 1.5 mm. Se utilizaron 6 repeticiones en 4 pruebas en una solución de (*Hura crepitans*) al 0%(T0) - 3,12%(T1) - 6,25%(T2) - 50%(T3).Se prepararon muestras en portaobjetos para cuantificar los micronúcleos de las células de los tejidos jóvenes. La aplicación de (*Hura crepitans*) como repelente no, es recomendable ya que afecta al crecimiento de la raíz, posteriormente puede causar la mutación genética por su alta toxicidad del látex. Sin embargo, se plantea como un posible control de arvenses.

Palabras clave: Toxicidad, genética, látex, *Hura crepitans*, micronúcleos.

INTRODUCCION

El ochoo, conocido científicamente como *Hura crepitans*, es un árbol tropical que se destaca no solo por su impresionante mecanismo de dispersión de semillas, sino también por la presencia de un látex que se encuentra en su corteza. Este látex ha suscitado interés en diversas áreas de investigación, especialmente en el ámbito de la toxicología, debido a sus propiedades químicas y potenciales efectos biológicos.

A pesar de su belleza y utilidad en la fabricación de artesanías, se ha documentado que varias partes del árbol pueden ser tóxicas si se ingieren, lo que plantea interrogantes sobre su seguridad en el entorno agrícola. En la región de Palos Blancos Alto Beni se utiliza esta especie forestal para construcción, fines medicinales y en agricultura. El principal problema para hacer el aprovechamiento de esta especie forestal es el látex que emana al momento de cortar su corteza debido a que es altamente tóxico para la piel y los ojos.

OBJETIVO

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la mutación y toxicidad del látex de

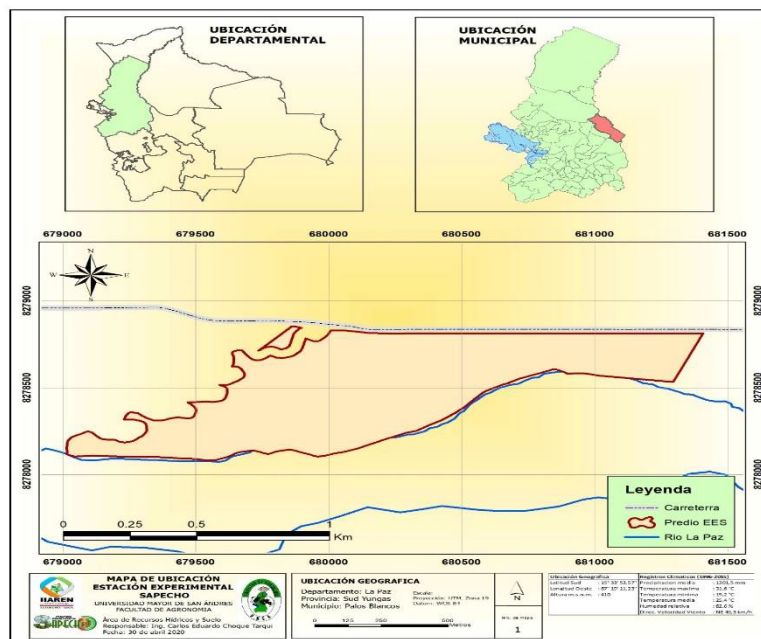
Hura crepitans en cebollines (*Allium fistulosum*), una planta de gran importancia culinaria y económica. A través de esta investigación, se busca determinar el impacto del látex en el crecimiento y desarrollo de los cebollines, así como identificar posibles efectos adversos que puedan surgir de su exposición. Los resultados de este estudio no solo contribuirán a una mejor comprensión de la toxicidad del látex de ochoo, sino que también proporcionarán información valiosa para uso como biocontrolador de arvenses.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Localización

La investigación se realizó en la Estación Experimental de Sapecho (E.E.S.), dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, ubicada al norte del departamento de La Paz, en la región denominada Alto Beni. Se encuentra en la provincia Sud Yungas, Municipio de Palos Blancos, localidad de Sapecho (Figura 1). Las coordenadas de la ubicación geográfica son: 15° 33'49, 34" Latitud Sur y 67° 19'24, 18" Longitud Oeste, a 260 km de la capital del departamento de La Paz, con una altitud de 422 msnm.

Figura 1. Mapa de la Estación Experimental Sapecho



Preparación de soluciones de latex de *Hura crepitans* (0%, 3.12%, 6.25% y 50%) y cebollines

Se selecciono la especie forestal (*Hura crepitans*), con el objetivo de evaluar la mutación y toxicidad de células vegetales bajo cuatro tratamientos diferentes de látex: (T0; 0% de látex y 100% de agua), (T1; 3.12% de látex y 96.88 de agua), (T2; 6.25% de látex y 93.75% de agua), (T3; 50 % de látex y 50% de agua). A continuación, se prepararon las muestras y se retiraron las raíces viejas para cortar las hojas de los cebollines (figura 2). (*Allium fistulosum*) a 5 (cm) de altura. Esto con el fin de que las pruebas se realicen con material fresco y adecuado.

Se remojaron los bulbos de cebollines, de

manera que se introdujo el bulbo con agua hasta la mitad. Se dejaron en remojo durante un día para facilitar la absorción de agua y crecimiento de raíces (figura 3). Posteriormente se midieron las raíces inicialmente en (mm) con papel milimetrado y se registraron los datos en planillas para constar su crecimiento, con lo cual se pudo determinar su toxicidad.

Aplicación de los tratamientos en cebollines

Se sumergieron las raíces en las soluciones de látex correspondientes al 0%, 3.12%, 6.25% y 50% durante 48 horas. En la preparación de muestras para el análisis se cortaron las raíces después de la exposición, todas a una longitud de 1 cm y se colocaron en tubos eppendorf. Reposaron entre 6 a 23 horas y después

se cubrieron con solución fijadora(figura4). Después, se colocaron las raíces en los tubos eppendorf para preservar su estructura celular y en el procesamiento de muestras de extracción se utilizó una jeringa para retirar la solución fijadora y añadir etanol al 70% con el fin de deshidratar las muestras(figura5).

Lectura y análisis

Se prepararon las muestras de raíces para verificar en el microscopio, pero antes, se colocaron 3 raíces seleccionadas por cada

tratamiento en un tubo eppendorf con ácido clorhídrico (HCl). A estas se le realizaron un baño maría por 5 minutos, donde se cortó la parte terminal de las raíces a (3mm) con Gillette, para colocarlo en el portaobjetos. Se adhirió una gota de orceína, se llevaron las muestras vegetales a una caja Petri y se esperaron 25 minutos. A continuación, se cubrieron con cubreobjetos y papel secante para presionar y eliminar el exceso de agua. De esta manera, se llevaron al microscopio y se hizo la lectura del ensayo (figura 6,7).

Figura 2. Preparación de cebollines: A. Corte de raíces y excedentes; B. Establecimiento del ensayo.



Figura 3. Toma de muestra: C. 4 Tratamientos del (0%, 3,12% 6,25%,50%); D. Prueba de ensayo.

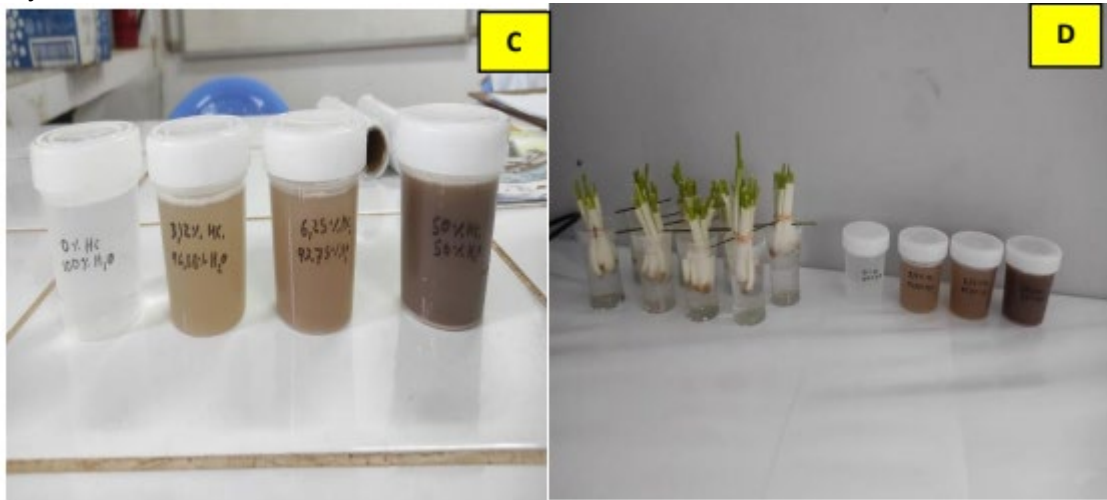


Figura 4. Metodología para la marcación de núcleos: E. Muestras de raíces en tubos eppendorf; F. Aplicación de orceína en las muestras.

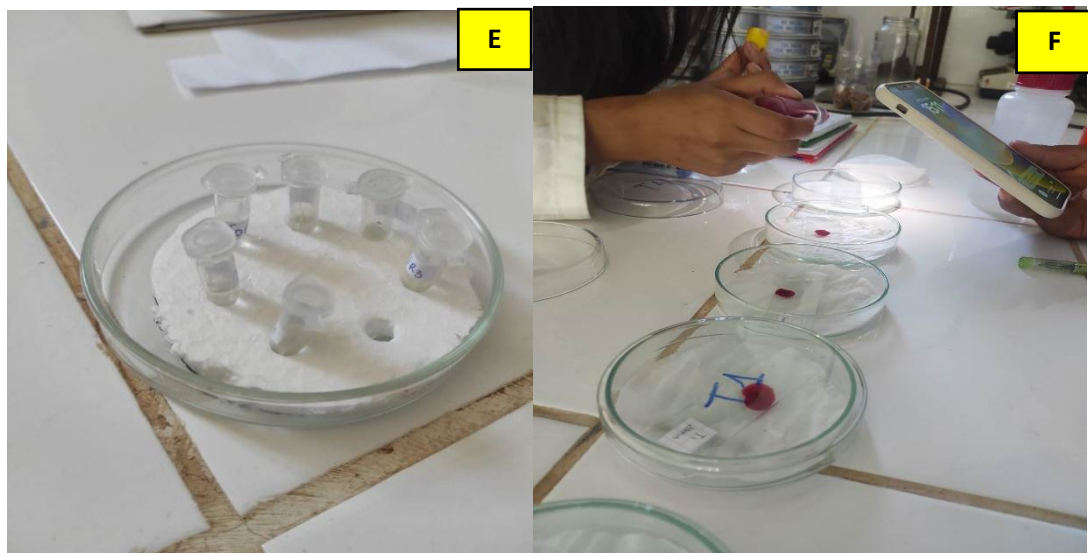


Figura 5. Medición: G. Primera y segunda medición de cada una de las raíces H. Resultados de crecimiento de raíces.

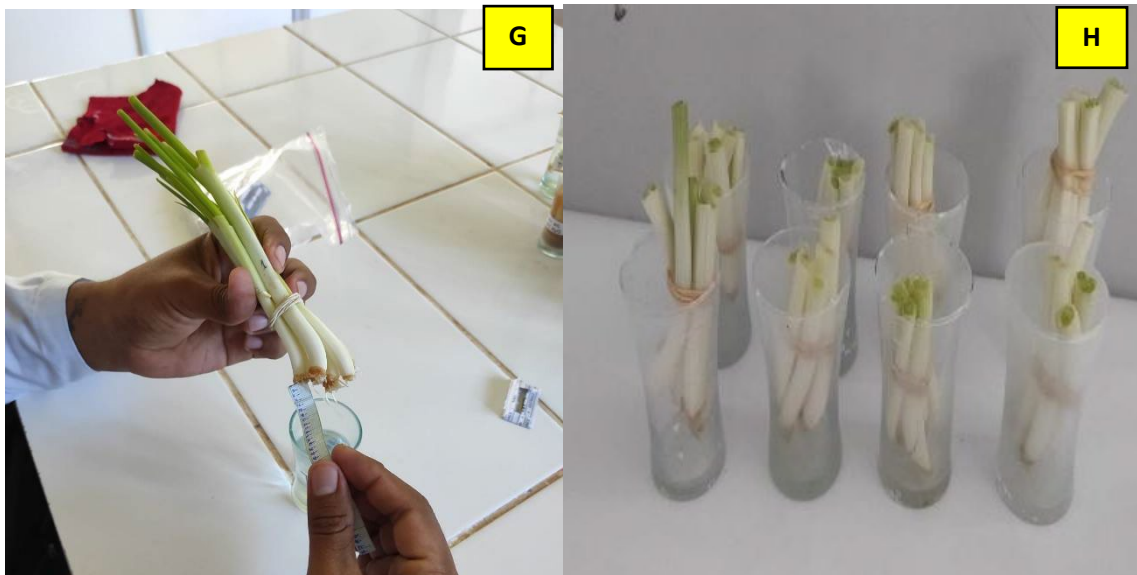


Figura 6. Análisis y diagnóstico: I. Observación de muestras en microscopio. J. Células vegetales con núcleos marcados.

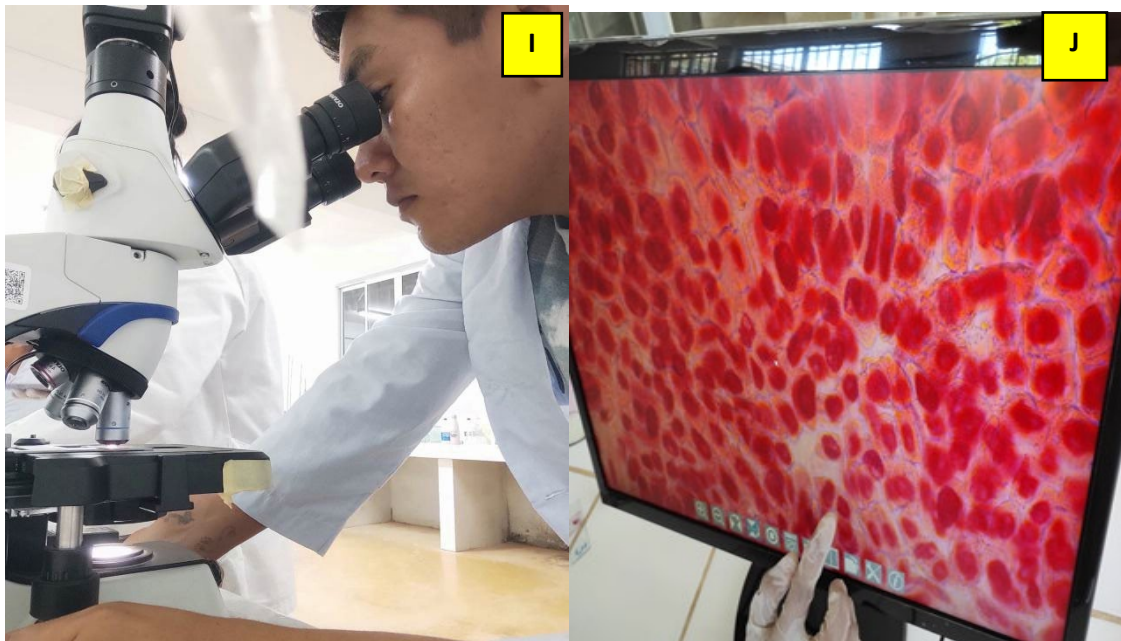
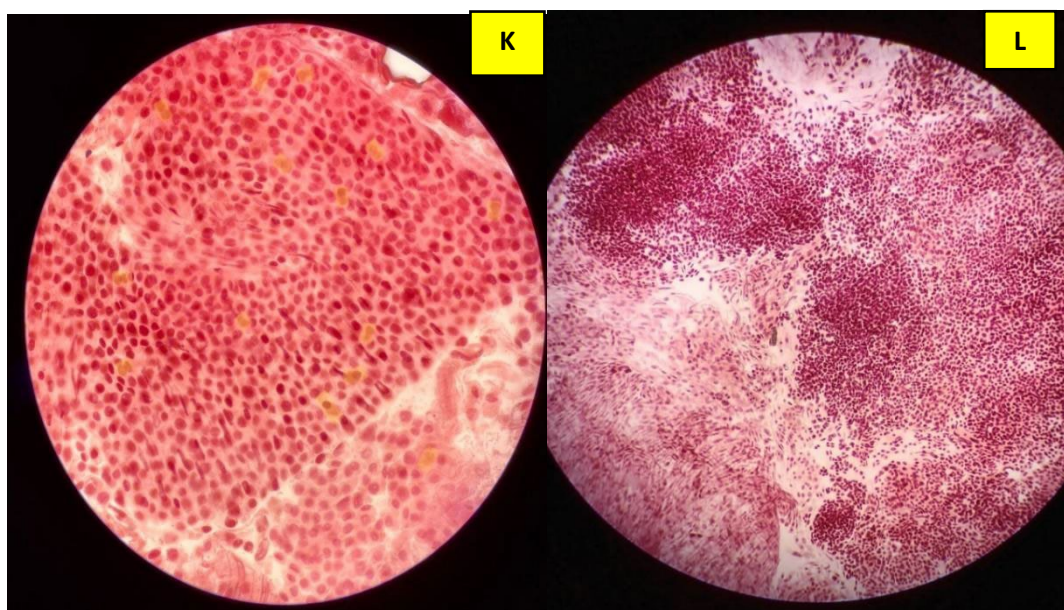


Figura 7. Observación con microscopio: K. Lectura de micronúcleos en mutación (40x) L. Lectura de micronúcleos en mutación (10x).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Resultado estadístico de crecimiento de raíces en la ciudad de La Paz.

F. V	P - VALOR	ANALISIS DE VARIANZA				
TRATAMIENTO	<0,0001 **	VARIABLE	N	R ²	R ² AJ	CV
REPETICION	0,5258	CRECIMIENTO EN (mm)	20	0,95	0,93	26,27

Tabla 2. Resultado estadístico Test. Duncan de crecimiento de raíces en la ciudad de La Paz.

TEST: DUNCAN ALFA = 0,05					
TRATAMIENTOS	MEDIA	N	E. E	TEST.DUNCAN	
T0	18,00	5	0,82	A	
T1	4,40	5	0,82	B	
T2	3,60	5	0,82	B	
T3	1,80	5	0,82	B	

Según el análisis estadístico existe diferencia entre las medias de los tratamientos T0 respecto a T1,T2,T3. gráficamente se observa que la media del T0, alcanzado 18 (mm) de longitud. el

coeficiente de varianza es igual a 26.27 % rango aceptable, el valor de R2 es 0,95 que indica una buena correlación entre los tratamientos y la longitud de raíz para los tratamientos.

Figura 8. Grafica de barras del crecimiento de raíces en la Ciudad de La Paz.

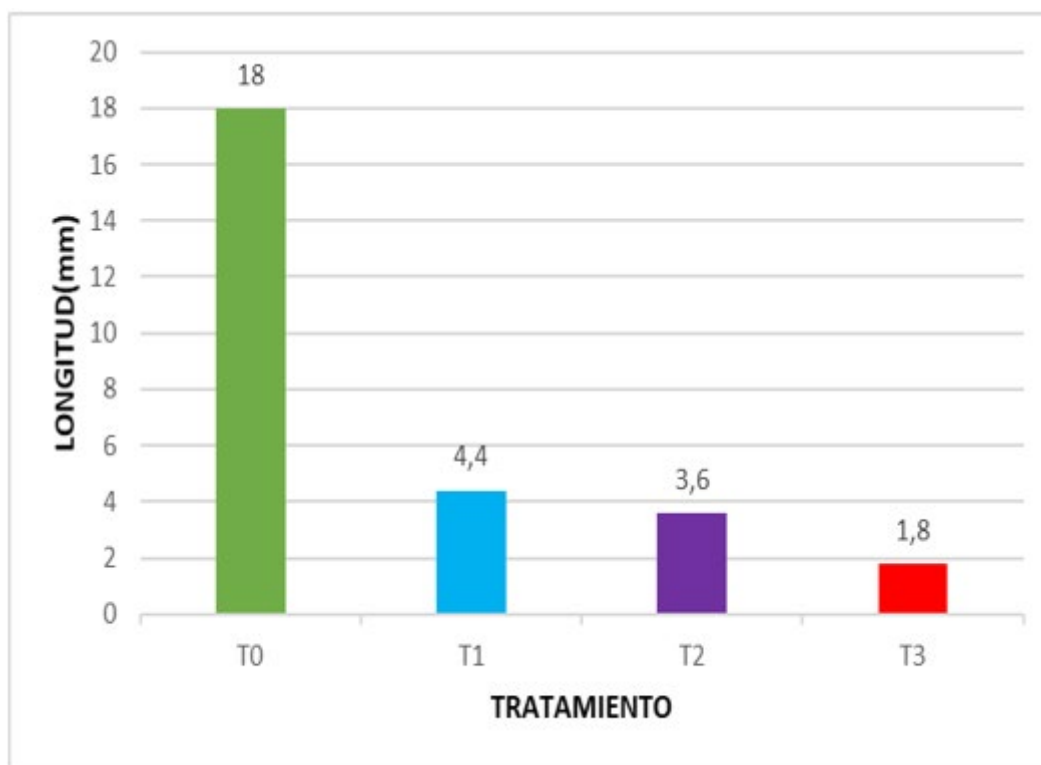


Tabla 3. Resultado estadístico de crecimiento de raíces en la Estación Experimental Sapecho.

F. V	P - VALOR	ANALISIS DE VARIANZA				
TRATAMIENTO	0,1037 N.S.	VARIABLE	N	R ²	R ² AJ	CV
REPETICION	0,7422	CRECIMIENTO EN (mm)	20	0,45	0,12	20,87

Tabla 4. Resultado estadístico Test. Duncan de crecimiento de raíces en la Estación Experimental Sapecho.

TEST: DUNCAN ALFA = 0,05				
TRATAMIENTOS	MEDIA	N	E.E	TEST.DUNCAN
T1	6,43	5	0,51	A
T2	5,80	5	0,51	AB
T3	4,93	5	0,51	AB
T0	2,65	5	0,51	B

Según el análisis los tratamientos son iguales estadísticamente sin embargo en la prueba de tukey el T1 es diferente al T0 y en tratamientos son iguales. el coeficiente

de variación de esta prueba es de 20.87 que está dentro el rango aceptable.

Figura 9. Grafica de barras del crecimiento de raíces en la Estación Experimental Sapecho.

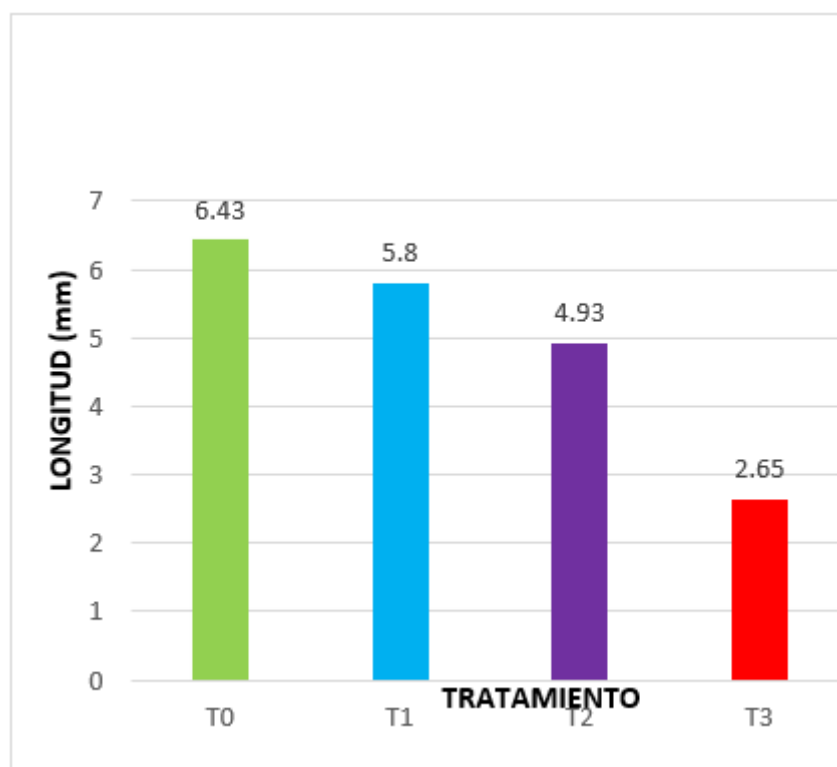


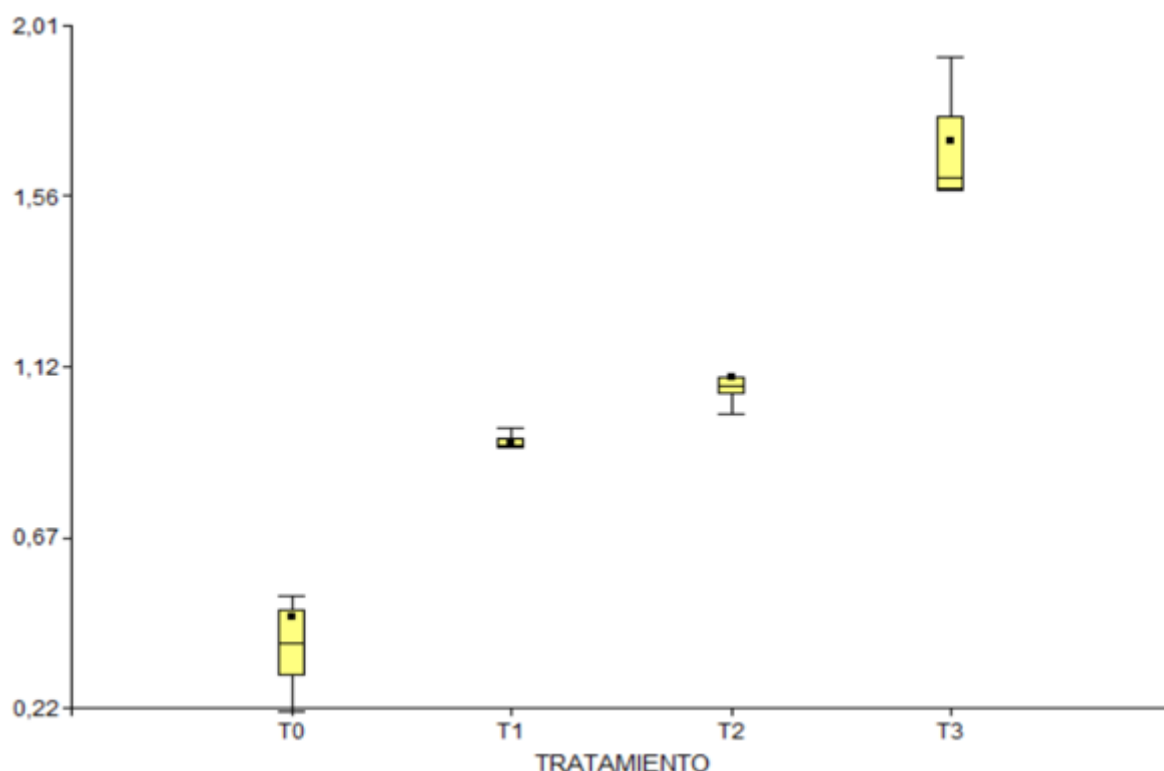
Tabla 5. Resultado estadístico de conteo de micronúcleos.

F. V	P - VALOR	ANALISIS DE VARIANZA				
		VARIABLE	N	R ²	R ² AJ	CV
TRATAMIENTO	0,0001					
REPETICION	0,3396	CRECIMIENTO EN (mm)	12	0,97	0,94	11,57

Tabla 6. Resultado estadístico de Test. Duncan en conteo de micronúcleos.

TEST: DUNCAN ALFA = 0,05				
TRATAMIENTOS	MEDIA	N	E. E	TEST.DUNCAN
T3	1,71	3	0,07	A
T2	1,09	3	0,07	B
T1	0,92	3	0,07	B
T0	0,46	3	0,07	C

Figura 10. Diagrama de caja de la cantidad de micronúcleos de cada tratamiento.



Según el gráfico de cajas la media del T3 ha sido mayor respecto a los tratamientos T0,T1,T2. la cual muestra mayor multiplicación de micronúcleos con la aplicación del látex de *Hura crepitans* al 50 % de concentración.

El coeficiente de varianza del T3 es diferente al T0 y el T1,T2 son iguales estadísticamente

CONCLUSIONES

Se determina que en la ciudad de La Paz se obtiene resultados más óptimos para el T0 (sin látex), en comparación con los resultados obtenidos en condiciones tropicales (Municipio de Palos Blancos), los cuales no han tenido diferencia entre tratamientos en el crecimiento vegetativo

de raíces de cebollín.

La mutación celular que implica la solución al 50% de concentración de Hura crepitans presentó mayor cantidad de micronúcleos, con lo cual se determina que la morfología y formación de células son anormales, por tanto, la cantidad de micronúcleos representa aberraciones celulares que implican modificación a nivel genético.

Este estudio podría ser un precedente para probar la sustancia del látex como un inhibidor de crecimiento en especies vegetales no deseadas.

BIBLIOGRAFÍA

Birk G. 1995. Plantas útiles en bosques y pampas chiquitanas (Un estudio etnobotánico con perspectiva de género). APCOB, Santa Cruz, Bolivia. Pag. 263.

Chichignoud M., Deon G., Detienne P., Paran B. & Vantomme P. 1990. Atlas de las Maderas Tropicales de América Latina. OIMT-CTFT. Abbreville, France. 14 pp lado de Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos. Steviana 4: 47–64.

Omisore, N. O. A.; Adewunmi, C. O.; Iwalewa, E. O.; Ngadjui, B. T.; Adenowo, T. K.; Abegaz, B. M.; Ojewole, J. A. & Watchueng, J. (2005). Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia*

barteri and *Dorstenia convexa*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38(7):1087-1094.

Patiño Cabral, L. M.; Domínguez, S.; Martínez, P.; Gayozo Melgarejo, E.; De Oliveira, R.; Torres, E.; Ocampos Jara, R. M. & Marín Insfrán, L. (2019). Evaluación mutagénica del extracto etanólico de rizomas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. en células meristemáticas de *Allium cepa* L. Journal of Basic & Applied Genetics (30) Suppl. 1: 330.

Quevedo, A. & Pires, E. (2011). Atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Rodrigo, G. (2007). Actividad genotóxica de *Opuntia soehrensii*, evaluada por el test de mutación y recombinación somática en *D. melanogaster*. Biofarbo, 15: 61-66.

Rodrigues De Andrade, H.H.; Reguly, M. L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. En *Drosophila*

- Cytogenetics Protocols, Ed. D. S. Henderson, 389-412. Humana Press. Totowa. New Jersey. Roosevelt, L. C. P.
- Roosevelt, C. V. & Valdés O. F. F. (2016). Ozonoterapia. Libros en Red. Santa Fe, 38-39 pp.
- Singh, K.P.; Dwevedi, A.K. & G. Dhakre. (2011). Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 2(3): 398–401.
- Uchiyama, T., Hara, S.; Makino, M. & Fujimoto, Y. (2002). Seco-Adianane Type Triterpenoides from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). Elsevier. 60(8): 761-764.
- Welter, S. (2012). Levantamento de plantas medicinais utilizadas como antiofídicas nas reducoes jesuítico-guaraní (Provincia Jesuítica do Paraguai, séculos XVII e XVIII). Rio Grande do Sul: UFRGS.
- Roosevelt, C. V. & Valdés O. F. F. (2016). Ozonoterapia. Libros en Red. Santa Fe, 38-39 pp.
- Singh, K.P.; Dwevedi, A.K. & G. Dhakre. (2011). Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 2(3): 398–401.
- Uchiyama, T., Hara, S.; Makino, M. & Fujimoto, Y. (2002). Seco-Adianane Type Triterpenoides from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). Elsevier. 60(8): 761-764.
- Welter, S. (2012). Levantamento de plantas medicinais utilizadas como antiofídicas nas reducoes jesuítico-guaraní (Provincia Jesuítica do Paraguai, séculos XVII e XVIII). Rio Grande do Sul: UFRGS.

35 - Medio Ambiente y contaminación ambiental

Cambios productivos en la Comuna de Alpachiri y El Molino (Chicligasta, Tucumán) a partir de la creación del Parque Nacional Campo de los Alisos-Aconquija (1995-2025)

Autor: Osores, Sergio Jesús Tomás; email: osoressergiojt@gmail.com

Orientador/a: Salim Grau, Jacqueline; email: jacquisalimgrau@gmail.com

Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Filosofía y Letras

Resumen

No cabe dudas que la creación de áreas protegidas en el ámbito nacional ha permitido la protección de una diversidad de recursos naturales y culturales que la actividad humana pone en peligro constantemente y que se ha agudizado últimamente con la implantación de un modelo extractivo neoliberal. Por otro lado, es lógico suponer que el establecimiento de estas áreas de protección ha generado cambios en los territorios donde se insertan. Dichos cambios asumen el carácter de conflictos cuando se ven afectados los intereses de los diversos actores que interactúan el área.

Nuestro estudio está centrado en la identificación y análisis de los cambios producidos respecto al uso del suelo (principalmente forestal, ganadero y agrícola) en la comuna rural de Alpachiri y El Molino, en tanto zona de amortiguamiento, a partir de la creación del Parque Nacional Campo de los Alisos (1995), posterior Parque Nacional Aconquija (2018).

Palabras clave: áreas protegidas, actores, uso del suelo.

Introducción

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación *“Cambios y conflictos en la comuna de Alpachiri y El Molino (Chicligasta, Tucumán) a partir de la creación del Parque Nacional Campo de los Alisos-Aconquija (1995-2024)”*, en el marco del PIUNT *“Nuevos Territorios, Nuevos Paisajes en contexto de Globalización. Articulaciones teóricas y empíricas en torno a los diferentes procesos de valoración de los paisajes del Noroeste Argentino”* (Resolución HCS de la UNT 0356/ 2023). A diferencia del proyecto de origen, aquí vamos a analizar únicamente los cambios en los usos del suelo que se produjeron en la comuna a partir de la creación del parque, un tema que no ha sido tratado en profundidad y que resulta imprescindible para la gestión del área protegida, como así también para la de las comunidades aledañas.

La actividad antrópica ha puesto en riesgo paisajes naturales a partir de diferentes actividades realizadas para saciar sus necesidades, como la agricultura, el pastoreo, la pesca, la caza, etc., como así también actividades de ocio o deportivas. En este sentido, se degradan estos espacios naturales mediante el deterioro del suelo, deforestación y pérdida de la biodiversidad. A fin de conservar estos

paisajes y retrotraer estas actividades perjudiciales se crean instrumentos legales como las áreas protegidas, que tienen diversos objetivos dentro de la conservación y, por ende, diferentes actividades permitidas en ellas, dependiendo de la categoría de conservación. Son esenciales para conservar la biodiversidad, al igual que los bienes y servicios ambientales que brindan a la sociedad. Los paisajes protegidos personifican valores culturales importantes; algunos de ellos reflejan las prácticas sostenibles de la utilización de la Tierra (Valor Ambiental, 2021). Además, son espacios en donde el hombre puede experimentar paz, revigorizar su espíritu y desafiar sus sentidos. Son importantes para investigación y educación, y contribuyen a las economías locales y regionales (Gobierno de la Nación Argentina, 2024).

Objetivos

En nuestro caso, la creación del Parque Nacional Campo de los Alisos en el año 1995, y su posterior transformación en Parque Nacional Aconquija en el año 2018, generó cambios en los servicios y usos del suelo -los cuales serán identificados y analizados en este trabajo-, en la comuna Alpachiri y El Molino, tanto en las zonas que quedan dentro del área protegida como en su zona de amortiguamiento.

También generó conflictos, principalmente entre las autoridades del parque, por un lado, y vecinos y productores, por el otro. A partir de este planteo nos surgen los siguientes interrogantes, ¿Qué cambios se generaron en la comuna Alpachiri y El Molino a partir de la creación del Parque Campo Los Alisos - Parque Nacional Aconquija?, ¿Qué consecuencias conllevan estos cambios en la Comuna?, ¿Cuáles fueron los cambios productivos, a quiénes beneficia y a quiénes afecta?, ¿Hubo cambios en los usos del suelo en la Comuna?, ¿Hubo cambios ambientales?, ¿Se generaron conflictos a partir de estos cambios?, ¿Cómo se relacionan los pobladores de la comuna con las autoridades y trabajadores del Parque?, ¿Cuál es el balance de estos cambios?.

Materiales y métodos

Marco teórico: nuestro trabajo se asienta en el paradigma moderno de la conservación, planteado por D'amico (2015), pues se considera la posibilidad de armonizar los objetivos de protección ambiental con las necesidades de las comunidades o personas que habitan esos espacios, con lo cual resulta imprescindible que se involucren en su manejo.

Los parques nacionales (PN), se definen como áreas a conservar en su estado natural, que sean representativas de una

región fitozoogeográfica y que tengan gran atractivo en bellezas escénicas o interés científico, las que serán mantenidas sin otras alteraciones que las necesarias para asegurar su control, la atención del visitante y aquellas que correspondan a medidas de Defensa Nacional adoptadas para satisfacer necesidades de Seguridad Nacional. En ellos está prohibida toda explotación económica con excepción de la vinculada al turismo, que se ejercerá con sujeción a las reglamentaciones que dicte la Autoridad de Aplicación. Por su parte, las zonas de amortiguamiento (ZAM) son territorios de transición entre un área protegida con categoría de manejo estricto y su entorno no protegido. Pueden ser parte de la unidad de conservación o externa a sus límites. En ellas se actuará con criterios de participación y concertación en relación con los habitantes locales, tendientes a la interacción gente-recursos en el marco de un uso sostenible de estos últimos. Es decir, la funcionalidad de esta zona es la de integrar el desarrollo con la conservación de los recursos naturales y culturales, en el marco del desarrollo sostenible (Ley nacional 22.351, 1980).

En tanto el paisaje definido por la Convención Europea del Paisaje (2000), como "cualquier parte del territorio tal como la percibe la población, cuyo carácter sea el resultado de la acción y de la interacción

de factores naturales y/o humanos”. Se trata de una acepción amplia ya que considera a todos los paisajes, independientemente de sus méritos. Ratifica la importancia de la percepción de la población en su proceso de definición y valoración y destaca el carácter de los paisajes como la marca o particularidad que deja cada sociedad en su territorio, y en este aspecto comienza el entendimiento del paisaje como patrimonio (Mata Olmo, 2006). en este sentido, la APN incluye nuestra área de estudio como Paisaje Aconquija, que incluye el Parque Nacional Aconquija y una propuesta de su zona de amortiguamiento que contiene a la Reserva Natural Santa Ana, el Parque Provincial La Florida y la Reserva Natural de la Defensa Quebrada del Portugués. Protege las nacientes de los ríos Jaya y Las Pavas, que recorren el este de las sierras del Aconquija y desembocan en los valles y campos de cultivo tucumanos. La región presenta tres estilos geomorfológicos definidos: la región montañosa, el pie de monte y la llanura aluvial.

En cuanto al concepto adoptado sobre el territorio, seguimos al geógrafo brasileiro Rogerio Haesbaert en el año 2011, el cual denomina al territorio como “un espacio relacional concreto, no solamente como un objeto material fijo, sino como dotado de una estructura más compleja, de carácter relacional, sobre todo considerando que el

territorio forma parte de la sociedad y, por lo tanto, es indisociable de la misma”.

Área de estudio: el Parque Nacional Campo de los Alisos (en adelante, PNCA) fue un área protegida ubicada en el departamento Chicligasta, al oeste de la provincia de Tucumán, en el límite con la provincia de Catamarca. Tuvo una superficie de 10.000 hectáreas y fue creado en 1995 mediante la Ley Nacional 24.526. Posteriormente, en 2018 se transforma en Parque Nacional Aconquija a través de la Ley Nacional 27.451/18 integrando su extensión previa y a la que se le suman territorios aledaños a la misma. El Parque Nacional Aconquija (en adelante, PNA) comprende una extensión de 76.207 hectáreas abarcando los departamentos Tafí del Valle, Monteros, Chicligasta, Río Chico y Juan Bautista Alberdi (Figura 1). Tiene como objetivo la conservación de las ecorregiones Selva de las Yungas y Altos Andes, como también la protección de especies amenazadas a nivel nacional o internacional, como el *Vultur gryphus* (cóndor andino), *Lontra longicaudis* (lobito de río), *Lama guanicoe* (guanaco), *Lycalopex culpaeus* (zorro colorado) y *Hippocamelus antisensis* (el monumento natural taruca). Comprende, además, la conservación de un importante sitio arqueológico asociado al Camino del Inca o Qhapac Ñan, como las ruinas de La Ciudacita, declarada Patrimonio Cultural

de la Humanidad por la UNESCO en el año 2014 (Sistema de Información de Biodiversidad, s/f).

En el departamento Chicligasta, el Parque se extiende en parte del territorio de la comuna de Alpachiri y El Molino, al sudoeste de la provincia de Tucumán, y el resto de esta jurisdicción pasa a integrar la zona de amortiguamiento (ZAM) del Parque Nacional Aconquija (Figura 2). Su ciudad cabecera es Alpachiri, aunque existen también otras localidades como El Molino, Piedra Grande, Calera, entre otras. Su ciudad cabecera es Alpachiri, aunque existen también otras localidades como El Molino, Piedra Grande, Calera, entre otras. En total, tiene una población de 5194 habitantes según el censo de 2010, de los cuales 1838 pertenecen a la localidad de Alpachiri. Las actividades de mayor importancia en la comuna son la agricultura, la ganadería, la silvicultura y la caza. En cuanto a la primera, el principal cultivo es la caña de azúcar, también destacan citrus, papa, batata y soja. En menor medida, hortalizas, palta, arándano y frutilla. También se cultivan tomate, pimiento, zapallo, choclo, batata y ajo. En las cercanías a Piedra Grande se cultivan especies exóticas como guayaba, kaki, kiwi, zarzamora, entre otros. Las actividades vinculadas al empleo público y al servicio de educación tienen un impacto significativo en la economía de las familias,

así como las relacionadas al comercio. Otros empleos son el servicio doméstico en viviendas particulares, la vinculada a la construcción y la recolección de musgo y leña (Paker, 2013). Metodología: para esta investigación utilizamos metodologías cuantitativas y cualitativas. En primera instancia realizamos una indagación bibliográfica de publicaciones e información (impresos y digitales) de organismos privados y estatales para la obtención de datos e información que nos permitió analizar los antecedentes sobre el área de estudio y examinar los conceptos básicos que orientan teóricamente esta investigación: paisaje, área protegida, zona de amortiguamiento, conservacionismo, cambios de uso del suelo. Además, indagamos en la cronología de creación de los Parques Nacionales Campo de los Alisos- Aconquija, en las particularidades naturales del área en cuestión y en los usos de suelo históricos.

Posteriormente, para identificar y analizar los cambios de tipo productivo usamos la técnica de la entrevista a informantes clave como autoridades del Parque, productores y vecinos de la comuna, a través de la cual indagamos sobre tales cambios. Una vez recabada la información necesaria - encuestas, informes, experiencias, imágenes, datos estadísticos- procedimos a la interpretación, análisis y

Estas actividades tradicionales ejercidas por los pobladores locales que se realizaban en las estancias que hoy pertenecen al PNA están vinculadas al pastoreo del ganado, la extracción de leña y musgo, la caza y la pesca y la agricultura.

Ganado

Para conocer la dinámica y algunas estimaciones con respecto a estas actividades entrevistamos a dos vecinos productores de la localidad Piedra Grande, perteneciente a la Comuna Alpachiri y El Molino. Con respecto al ganado, el primero de ellos, Estanislao¹, nos comenta: *“con mi familia tenemos animales en una mesada que conforma el PNA (Mesada La Negra), donde se pueden encontrar vacas y, en menor medida, corderos y chivos”*. Junto a la suya, otras 12 familias de productores poseen animales en estos terrenos, que estima abarcan una superficie de 1500 hectáreas. Es por esto que: *“es común el trabajo conjunto entre dos o tres familias, que se organizan para realizar labores que los benefician, como la vigilancia y control del ganado, el marcado de senderos y la construcción de rancharíos² y cercos y su mantenimiento”*.

Asegura que *“esta actividad –la ganadería– no tiene como finalidad la comercialización sino el consumo propio”*. Por otra parte, en estancias cercanas a la Laguna del Tesoro,

al suroeste de Estancia Jaya, estima que *“se encuentran animales de otras 25 a 30 familias, que contratan a un cuidador de la localidad que se aloja en los rancheríos para el cuidado del ganado”*. Asegura que todos los productores que conoce *“son vecinos de la localidad donde habita, Piedra Grande, a excepción de uno proveniente de la ciudad de Concepción”*.

La presencia de ganado en terrenos que hoy pertenecen al Parque se remonta a mediados del siglo XX (Figura 3), como manifiesta nuestro entrevistado, quien recuerda que ya en el año 1978 sus abuelos tenían vacas en la Estancia Santa Rosa (hoy Portal Campo de los Alisos) (Figura 1). Cuenta que él y su familia siguen con la tradición, pero la constitución del PNCA ha llevado a experimentar algunos cambios, como el traslado del ganado desde la Estancia Santa Rosa, que quedaría bajo protección del Estado Nacional, hacia Mesada La Negra, en Estancia Jaya, lindera hacia el sur de la anterior. Luego, con la transformación en Parque Nacional Aconquija en 2018, esta estancia se adhiere al mismo, de manera que el ganado permanece en su extensión definitivamente. Ante esta situación, *“autoridades del Parque se comunicaron vía telefónica con los dueños de los animales y crearon un grupo de WathsApp, mediante el cual las autoridades intentan controlar las actividades que vayan a*

1. Los nombres de los entrevistados son ficticios, para resguardar sus identidades.

2. Conjunto de construcciones pobres de madera, utilizados como depósitos o alojamiento.

realizarse en la estancia”. Es así que solicitaron, siguiendo el relato de nuestro entrevistado, que todo trabajo, como los antes mencionados o marcar o bajar un animal, debe ser detallado por este canal previamente a llevarse a cabo, seguido de una solicitud de permiso para realizarlo. Las autoridades, por su parte, concederán un “conforme” para el ingreso al área protegida. Hasta el momento, todas las solicitudes han sido respondidas positivamente.

Este relato coincide con el de nuestra segunda entrevistada, Cecilia. Comenta, además: *“los animales de mi familia no se encontraban en terrenos del Parque, por lo que para llegar a ellos bordeábamos el río Conventillo, limitante del PNCA al sur, con senderos que nosotros mismos marcamos”*. Pero con la ampliación del Parque en 2018 esa situación cambió, pues estas estancias quedaron bajo jurisdicción del área protegida, y ahora son controlados por las autoridades del PNA, que usan hoy los senderos que crearon los productores. Cecilia enfatiza una problemática que tiene su familia, y es el robo de sus animales. Estima que, *“de 30 cabezas, 15 fueron robadas”*. En este sentido, plantea que *“de la misma manera en que nos solicitan –las autoridades del parque- emitir un permiso, debieran fortalecer las tareas de vigilancia de los senderos y protección de los animales”*

que, además, comenta, *“son devorados por los leones –del monte- (pumas)”*, manifestando la inestabilidad de la actividad.

El relato de ambos coincide en que las autoridades del Parque no sólo controlan las actividades que los productores realizar en las estancias donde se encuentran sus animales, sino que *“quemaron rancheríos en la Estancia Las Pavas y casas en El Saladillo”*, para forzar el cese de las actividades en esos terrenos. Esta situación llevó a la decisión de algunas familias de vender sus haciendas y rancheríos. Por otra parte, comentan que *“los trabajadores del Parque revalorizaron y reutilizaron construcciones que quedaron dentro de la jurisdicción del área protegida”*, como las del actual Centro Operativo Santa Rosa (Figuras 4 y 5), donde se encuentran un camping, un centro de información y viviendas para guardaparques, y El Chalet, cercano a Estancia Jaya. El ganado y sus actividades vitales tienen un impacto considerable en un ambiente y las relaciones ecológicas que en él se desarrollan. Siguiendo el informe *Livestock's long shadow*, producido por la Food and Agriculture Organization (FAO) de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) en el año 2006, la actividad pecuaria afecta al suelo, el agua y la biodiversidad de un ambiente. En primer término, el suelo es compactado por

el pisoteo de los animales, dificultando la infiltración del agua. Además, al alimentarse de la cobertura vegetal, desprotege al suelo, desnudándolo y exponiéndolo a la erosión fluvial y eólica. Por otra parte, los desechos de los animales son ricos en nitrógeno y fósforo, que puede contaminar por exceso de estos nutrientes a los cursos de agua por escorrentía y a las napas freáticas por

infiltración, generando una eutrofización, es decir, un crecimiento excesivo de algas y una consecuente disminución del oxígeno. Finalmente, la biodiversidad del ecosistema se ve afectada por la depredación selectiva de algunos vegetales por parte de los animales, afectando de esta manera a las cadenas tróficas.

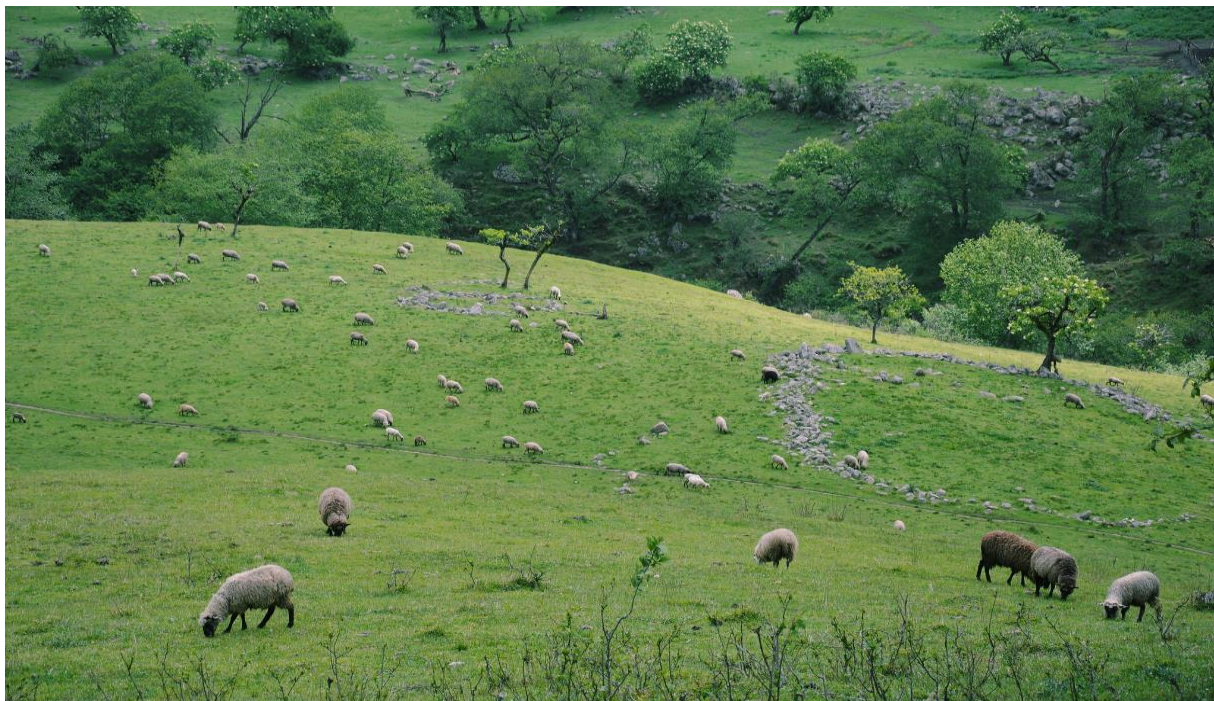


Figura 1: Ganadería en PNA

Fuente: Suteba.com (s/f)



Figuras 2 y 5: Centro Operativo Santa Rosa

Fuente: Elaboración Propia

Musgo y leña

La extracción de musgo y leña, como la recolección de palo podrido, ha sido muy importante para la subsistencia de los pobladores. Es una práctica tradicional que ha persistido de generación en generación y que hoy se encuentra prohibida. En este sentido, Estanislao estima que *“de estas actividades, unas 40 o 50 familias se beneficiaban antes de la constitución del Parque mediante sus uso y venta”*.

El **musgo** es una planta briófito de ambientes húmedos, de gran importancia para los bosques, principalmente por su capacidad para absorber el agua y, al mismo tiempo, para ir liberando esa agua en función de la sequedad del ambiente. Esto es esencial para evitar tanto los

excesos de agua, como la desertización del suelo. También es el hábitat esencial para la alimentación y protección de muchos microorganismos (Parque Nacional Aconquija, 2022) (Figura 6). Otro entrevistado, Víctor, y su familia eran vendedores de musgo. Este vegetal es utilizado con fines decorativos y sus compradores eran en su totalidad de la ciudad de Concepción. Esta actividad, comenta, *“era el sostén único económico de 10 familias de Piedra Grande”*, donde reside. La llegada del PNA les prohibió esta actividad, mediante informe de autoridades Parque, de manera que las familias quedaron sin su actividad económica generacional. A raíz de esto, incluida la de Víctor, las familias debieron buscar otra fuente de trabajo. Es así que accedieron a la cosecha de limón y papa. Pero esta actividad trajo consigo una serie de



Figura 6: Musgo en el Parque Nacional Aconquija

Fuente: Parque Nacional Aconquija (2021)

desventajas, entre las cuales destacan; en primer lugar, la gran distancia que los separa del cultivo del limón, ubicado en departamento Famaillá, lo que los obliga a trasladarse en primera instancia a la ciudad de Concepción, donde son recogidos los cosecheros hacia el lugar de trabajo. En segundo lugar, este trabajo es temporal, la cosecha de limón se realiza entre los meses de abril a agosto y la de papa desde noviembre a diciembre, por lo que durante los meses inter cosechas quedan sin sustento. Además, al ser trabajos informales, no cuentan con un programa intercultural que les asegure un ingreso en los meses sin cosecha. Una tercera desventaja, y quizás la más importante, es

que sus ganancias con los nuevos trabajos “son menores que las de extracción de musgo”.

Es importante señalar que, mediante autoridades del Parque, se ha gestionado una financiación para producir musgo en invernadero en la Comuna, de la que se esperan respuestas. De realizarse, sería la primera producción de estas características en el país.

Por su parte, la extracción de leña y la recolección de palo podrido “se realizaban para uso doméstico, como combustible para el fuego de hogar”. Las principales especies extraídas eran cedros, nogales, alisos y pinos del cerro, como se indica en

una placa del PNA en Puesto Los Chorizos (Figura 7).



Figura 7: Cartel Puesto Los Chorizos

Fuente: Google Maps (2017)

Una fuente importante para comprender el impacto que tuvo la tala y el sobrepastoreo sobre el ecosistema que hoy compone el área protegida y su biodiversidad es la carta que escribió Orlando Bravo, personalidad fundamental para la creación del PNCA, a otro compañero montañista sobre su regreso al lugar luego de varios años, en el que se encuentra con una modificación visible del ambiente por la actividad antrópica.

“Querido amigo: acabo de llegar de un viaje a los Nevados del Aconquija, siguiendo la ruta de Las Mesadas [...] y he sido presa de una terrible angustia, algo así como cuando se encuentra a un querido amigo de la juventud transformado en un anciano decrepito y desválido. [...] La voracidad e irracionalidad sin límites están haciendo peligrar hasta un punto

irreversible aquellos escenarios que también supieron de tus pasos y que llenaron tus ojos de imágenes inolvidables y el corazón de inefables emociones” (Cultura de montaña.org, s/f).

Actualmente, la actividad se encuentra prohibida por las autoridades del Parque, y según los testimonios de nuestros entrevistados, se encuentra limitada al uso de leña que bordea los caminos cercanos a la localidad, externo al área protegida.

Caza y pesca

La caza y la pesca han sido también actividades tradicionales por parte de los pobladores locales, dedicadas en su totalidad al consumo propio, aunque también existían cazadores provenientes de otras localidades. Las especies más buscada por los cazadores son el chanco del monte (pecari tajacu) (Figura 8) y la corzuela parda (mazama gouazoubira) (Figura 9).

Por su parte, Estanislao nos comenta que *“la pesca se dirige mayormente a sábalos (prochilodus lineatus)”* (Figura 10), también para consumo propio. Actualmente, indica

Cecilia, “no se ha eliminado sino restringido a la pesca con caña exclusivamente”.



Figura 8: Chancho del monte

Fuente: Sistema de Información de la Biodiversidad (SIB) (s/f)



Figura 9: Corzuela parda

Fuente: SIB (s/f)



Figura 10: Sábalo

Fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (s/f)

Agricultura

Otro cambio de gran importancia económica, social y laboral ocurrido en la Comuna a partir de la creación del Parque Nacional es el fomento del cultivo y producción de chilto y uchuva. Sobre estas actividades nos informó Alina Sveruga, autoridad del PNA.

“El **chilto** es un fruto similar al tomate (Figura 11), nativo de la ecorregión de las Yungas, muy consumido en la provincia de Jujuy y en países como Colombia y Ecuador, que pueden encontrarse algunas plantas nativas en el monte de la comuna. En nuestra provincia existían ya plantaciones en el departamento de Tafí Viejo, realizadas por la Cooperativa Agroforestal de Chilteros y fomentadas por COPRODESA Asociación Civil. A partir de esto, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), mejoró las condiciones de las semillas, para adaptarse a las condiciones edáficas y climáticas de la comuna”.

Es así que un grupo de nueve familias, particularmente de la localidad de Piedra Blanca:

“empezó, mediante la creación de una cooperativa, con el cultivo de chilto en sus fincas, con el asesoramiento técnico y productivo de la cooperativa taficeña, COPRODESA y el Instituto Nacional de la

Agricultura Familiar, Campesina e Indígena (INAFCI), este último mediante talleres, fortalecimiento educativo y cooperativismo. También se realiza una recolección y cuidado de las plantas nativas en el monte de la Comuna y la compra de frutos a otras familias. El destino de la recolección es principalmente la producción de mermeladas y escabeches (Figura 12), también se gestionó la venta de los frutos al Mercado Central de Buenos Aires”.



Figura 11: Cultivo de chilto en Piedra Grande

Fuente: Elaboración propia



Figura 12: Mermelada y escabeche de chilto

Fuente: Parque Nacional Aconquija

En el año 1995, a poco tiempo de su creación, el Parque Nacional Campo de los Alisos fomentó la creación de la Asociación Civil Piedra Grande. Posteriormente, “mediante el proyecto de Desarrollo de Actividades Sustentables (DAS), financiado por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) se construyó el salón de uso comunitario en la localidad”. Asimismo, se presentaron proyectos al Ministerio Público Fiscal a partir de los cuales se equipó la cocina en el salón con anafe, balanzas, ollas, utensilios y productos para su mantenimiento. Al mismo ministerio se solicitaron también herramientas para el cultivo como cerruchos, palas, tijeras de poda, etc. (en espera). Además, se requirió al Fondo Ilercocinas financiamiento para la ampliación del salón y cocina. Otro pedido en espera es el realizado al Rotary Club para mejorar las viviendas de Alpachiri y para cerrar el predio donde se ubica el salón. Es importante resaltar que se

encuentra en espera el financiamiento ya aprobado de mejoras en la infraestructura y la producción de chilto a través del proyecto “Recuperación Sustentable de Paisajes y Medios de Vida”.

Otro vínculo con participación del PNA y el movimiento social Tucma fue la visita del Frente Amplio para una Nueva Agronomía (FANA), dependiente de la Universidad de Buenos Aires, que cooperó con el diseño de huertas, métodos de producción y venta de productos en ferias porteñas. También se gestionó la visita de la Fundación La Tierra de Nuestros Hijos (Buenos Aires) que capacitó sobre el cultivo y el valor agregado y turismo rural. A su vez, el Punto Ecológico de Concepción “provee a la cooperativa de botes de vidrio, sachets y vasos plásticos para los plantines”. Mientras la empresa Citromax hizo lo propio con superpallets, bins, contenedores y tachos de metal y plástico tanto para la cooperativa como para la asociación. Indica también que “se busca coordinar con las otras tres cooperativas de chilteros (Tafí Viejo, Tolombón y Ocloyas, provincia de Jujuy) para intercambiar métodos y fijar precios”.

El personal del Parque Nacional Aconquija “ha gestionado y acompañado a la cooperativa y la asociación a capacitaciones realizadas por la UNSTA Emprendedores, Grupo GERTUC, entre

otros, como también su traslado”. Nos especifica la participación en 18 capacitaciones y seminarios en Santiago del Estero, Expo Lules, Simoca, San Miguel de Tucumán, Escaba, entre otras localidades. En este sentido, también “se les gestionó el carnet de alimentos, en la Dirección de Alimentos de la provincia, para poder vender sus productos en los eventos en que participan”.

El INTA se encuentra estudiando y promoviendo el cultivo de **uchuva** en la comuna Alpachiri y el Molino, un fruto similar al tomate, de color amarillo (Figura 13), cuyo destino sería la exportación a Estados Unidos. Comenta que “también se intenta elaborar mermeladas de otros productos como el arándano, cultivado en fincas privadas de la comuna, ante situaciones de escasez de chilto por heladas”.



Figura 13: Fruto de uchuva

Fuente: La Nación (2019)

Conclusiones

La institucionalización del Parque Nacional Campo de Los Alisos-Aconquija, con su finalidad conservacionista, generaron cambios en los ambientes que constituyen el área en cuestión, como la abundancia de ejemplares, la diversidad de especies, entre otros, mediante la prohibición de actividades que los perjudique y vulneren, como la caza, la pesca, la tala de árboles, la extracción de especies vegetales y el sobrepastoreo. Pero a la vez dieron lugar a una serie de conflictos ya que estas actividades no sólo representaban el sustento de gran parte de las familias locales, mediante consumo de víveres o venta de algunos materiales extraídos, sino también eran un legado simbólico y cultural heredado de sus antepasados. A partir de la creación del Parque debieron restringirlas o abandonarlas y recurrir a otras para solventar sus necesidades. Esta situación se desarrolla en medio de una serie de dificultades como las escasas oportunidades laborales, los traslados que requieren las nuevas actividades, la informalidad y las bajas remuneraciones. Esto ha generado una serie de conflictos entre las autoridades del Parque y los pobladores locales, al superponerse las necesidades y propósitos de ambos actores.

También se generaron cambios de balance positivo como el fomento del cultivo de chilto y uchuva y su posterior procesamiento y venta, como también los vínculos que fortalecen el cooperativismo.

Podemos concluir, de esta manera, que la creación del área protegida trajo aparejados cambios, de balances negativos y positivos para la Comuna, y que se deberán doblar los esfuerzos para que la conservación y la subsistencia de las comunidades locales y sus tradiciones pueden convivir en armonía

Bibliografía

- Administración de Parques Nacionales (2002). Directrices para la zonificación de las Áreas Protegidas de la APN. Recuperado de: https://sib.gob.ar/archivos/RES._74-02_HD_directrices_zonificacion.pdf
- Administración de Parques Nacionales (2023). Plan Anual de Trabajo. Recuperado de: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/pat_2023_uai-apn.pdf
- Administración de Parques Nacionales (2022). Proyecto de Recuperación Sustentable de Paisajes y Medios de Vida en Argentina. Recuperado de: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/resumen_ejecutivo_del_proyecto.pdf
- Convención Europea del Paisaje (2000). Convenio Europeo del Paisaje. Florencia, Italia. Recuperado de: <https://rm.coe.int/16802f3fbd>
- Cultura de Montaña (s/f). Historia del Parque Natural del Campo de Los Alisos. Recuperado de: <https://revistadigital.culturademontania.org.ar/articulo/646cc8cffc0d3efac6f6e3c1>
- D'Amico, M. (2015). Debates sobre conservación y áreas naturales protegidas: paradigmas consolidados y nuevos horizontes. Recuperado de: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/45564/CONICET_Digital_Nro.c1eb73e4-94e9-47f9-b47b-71adb4ba5a05_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Entorno Turístico (2017). ¿Qué es el turismo sostenible? Recuperado de: <https://www.entornoturistico.com/que-es-el-turismo-sostenible/>
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2006). Livestock's long shadow. Roma, Italia. Recuperado de: <https://www.europarl.europa.eu/climatechange/doc/FAO%20report%20executive%20summary.pdf>
- Gobierno de la Nación Argentina (2024). Áreas protegidas. Recuperado de: <https://www.argentina.gob.ar/ambiente/areas-protegidas>

- González Bernáldez, F. (1994). Investigación y gestión en espacios naturales protegidas. Madrid: Centro de Investigación de Espacios Naturales Protegidos.
- Goolge Maps (2017). Puesto Los Chorizos (PNA). Recuperado de: <https://www.google.com/maps/place/Puesto+Los+Chorizos>
- Haesbaert, R. (2011). El mito de la desterritorialización. México DF, México. Siglo XXI Editora Iberoamericana.
- La Nación (2019). Uchuva: la fruta del amor. Recuperado de: <https://www.nacion.com/revista-perfil/vida/uchuva-la-fruta-del-amor/ZDYNDQ7R2NCWLMTWL3YHZQGDEY/story/>
- Mata, R. y Doménech, M. (dirs) (2006): El paisaje y la gestión del territorio. Incorporación de criterios paisajísticos en la ordenación del territorio y el urbanismo. Barcelona, Diputació de Barcelona.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (s/f). Pesca continental. Recuperado de: magyp.gob.ar/sitio/areas/pesca_continental/especies/sabalo.php
- Ministerio de Justicia de la Nación (1980). Ley Nacional N° 22.351. Recuperado de: <https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/15000-19999/16299/texact.htm>
- Ministerio de Justicia de la Nación (1995). Ley Nacional N° 24.526. Recuperado de: <https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/25000-29999/26888/norma.htm>
- Ministerio de Justicia de la Nación (2018). Ley Nacional N° 27.451. Recuperado de: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-27451-313671>
- Miranda, C. (2002). Tucumán y los recursos naturales.
- MiTucuman (2010). Áreas Naturales Protegidas de Tucumán. Recuperado de: <http://mitucuman.blogspot.com/2010/03/areas-naturales-protegidas-de-tucuman.html>

- Parque Nacional Campo de los Alisos (2016). Plan de gestión Parque Nacional Campo de los Alisos. Recuperado de: https://sib.gob.ar/archivos/PG_PNCAlisos_julio_2016_comp.pdf
- Parque Nacional Aconquija (2021). Recuperado de: <https://www.instagram.com/p/CXyfJlIO8y-/>
- Sistema de Información de Biodiversidad (APN). Dicotyles tajacu <https://sib.gob.ar/especies/dicotyles-tajacu>
- Sistema de Información de Biodiversidad (APN) (s/f). Parque Nacional Aconquija. Recuperado de: https://sib.gob.ar/area/APN*AI*CAMPO%20DE%20LOS%20ALISOS
- Sistema de Información de Biodiversidad (APN) (s/f). Subulo gouazoubira. Recuperado de: <https://sib.gob.ar/especies/subulo-gouazoubira>
- Suteba (s/f). Parque Nacional Aconquija. Recuerado de: <https://www.suteba.org.ar/parque-nacional-aconquija-20394.html>
- Valle Buenestado, B. (1984). Geografía y espacios protegidos.
- Valor Ambiental (2021). Las áreas naturales protegidas como refugio de la biodiversidad de la Selva Misionera y garantía de los servicios ambientales para la humanidad. Recuperado de: <https://valorambiental.com.ar/las-areas-naturales-protegidas-como-refugio-de-la-biodiversidad-de-la-selva-misionera-y-garantia-de-los-servicios-ambientales-para-la-humanidad/>

35.- Medio Ambiente y contaminación ambiental

Modelado de contaminantes atmosféricos urbanos asociados al tránsito vehicular en el complejo Alem de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca, Argentina)

Autor: ^aCarrizo, Facundo M., fcarrizo@plapiqui.edu.ar

Co-autores: ^{a,b}Díaz, Mónica F., mdiaz@plapiqui.edu.ar; ^cFernández, M. Eugenia, eugenia.fernandez@uns.edu.ar; ^cGentili, Jorge O., jogentili@uns.edu.ar; ^{d,e}Grassi, Yamila S., yamila.grassi@uns.edu.ar

Orientadores: Díaz, Mónica F., Gentili, Jorge O.

^a*Planta Piloto de Ingeniería Química (UNS-CONICET)*; ^b*Dpto. de Ingeniería Química (UNS)*; ^c*Dpto. de Geografía y Turismo (UNS) – CONICET*; ^d*Dpto. de Ingeniería (UNS)*; ^e*Instituto de Matemática de Bahía Blanca (UNS-CONICET)*.

Resumen

El presente estudio está centrado en la evaluación del impacto de la movilidad urbana sobre la calidad del aire en la zona del complejo Alem de la Universidad Nacional del Sur en Bahía Blanca, Argentina. En este sector, altamente transitado, no existe monitoreo de calidad de aire, por lo tanto, la metodología empleada incluye el relevamiento de flujos vehiculares y segmentación mediante conteo manual por observación directa de grabaciones generadas *in situ*, y el uso del software AERMOD para modelar la dispersión de los dos contaminantes más representativos del tránsito, el monóxido de carbono (CO) y los óxidos de nitrógeno (NO_x). Se estudió el periodo set-2023/ago-2024 durante la hora pico del mediodía de un día hábil entresemana. Los resultados indican que las concentraciones máximas fueron de 103,4 µg/m³ para NO_x (o NO₂ según conversión por Tier 1) y 255,0 µg/m³ para CO en el sector de Avenida Alem-Córdoba, aunque no coinciden con los mayores flujos de tránsito. Esto se debe a que las condiciones meteorológicas son un factor determinante en la dispersión de contaminantes en la atmósfera, principalmente los vientos suaves y las inversiones de temperatura no favorecen el mezclado, por lo que se evaluaron en profundidad estos aspectos. Se determinó que los niveles de contaminación modelados están por debajo de los límites legales vigentes para la Provincia de Buenos Aires (Decreto 1074/2018: 188 µg/m³ (NO₂) y de 40.000 µg/m³ (CO)), y que solo el valor máximo de NO₂ estaría en un nivel moderado según el Índice de Calidad Aire, pero esto no significaría motivo de alerta respecto de la salud de las personas en general. Este trabajo presenta datos novedosos del sector, y contribuye a la toma de decisiones para una movilidad cada vez más sustentable.

Palabras clave: calidad del aire, movilidad urbana, entorno campus universitario

Introducción

La movilidad urbana es esencial para el desarrollo de las actividades cotidianas de los habitantes de una ciudad, y se refiere a todos los desplazamientos que las personas realizan utilizando los diferentes medios de transporte disponibles. Sin embargo, también genera impactos negativos en la sociedad como ser empobrecer la calidad del aire, crear congestión, producir inseguridad vial, entre otros. En este sentido, las ciudades tienen la capacidad de establecer políticas integrales para mitigar los efectos negativos de la movilidad urbana y promover una más sostenible, apoyándose en el conocimiento que tienen de las costumbres locales (Sultana *et al.*, 2017). Se considera que hoy en día, uno de los grandes retos de la movilidad urbana es encontrar un equilibrio entre los tres pilares de la sostenibilidad: económico, ambiental y social, lo que requiere estudiarla en profundidad y desde un enfoque holístico empleando las herramientas adecuadas (Miskolczi *et al.*, 2021).

Al momento de analizar la contaminación atmosférica proveniente de fuentes móviles es de utilidad emplear modelos de calidad de aire, sobre todo cuando se precisa estudiar áreas donde no se cuenta con mediciones *in situ*. El modelado de calidad del aire cumple una función clave en el diseño de políticas y acciones para el control de la contaminación atmosférica, ya que permite orientar de

manera precisa la planificación ambiental. Su propósito central es estimar la distribución espacio-temporal de diversos contaminantes en función de factores como las emisiones y las condiciones meteorológicas (Gulia, 2015). Por ejemplo, el modelo de dispersión recomendado por la EPA “AERMOD” (herramienta basada en supuestos de estado estacionario y evolución del antiguo modelo ISC3), se utiliza con fines regulatorios en varios países como Estados Unidos (Cimorelli *et al.*, 2005; USEPA, 2005).

La Universidad Nacional del Sur (UNS) fue fundada en 1956 en la ciudad de Bahía Blanca (Argentina), y cuenta con diferentes sedes entre las cuales se encuentran el complejo Alem y el campus Palihue. A diferencia del campus Palihue, de características cerradas y controladas, el complejo Alem presenta desafíos estructurales relacionados a la movilidad urbana, ya que esta zona se encuentra abierta al flujo de movilidad general de la ciudad, localizándose sobre la Avenida Alem, una arteria de gran importancia que conecta zonas densamente transitadas en la dirección noroeste-sureste. Es sabido que en el área del complejo Alem se crean situaciones de congestión vehicular en horarios picos, impidiendo a los peatones cruzar correctamente por las esquinas, y dificultando la circulación segura de las bicicletas. Cabe mencionar que no se cuenta con estudios previos realizados sobre movilidad y contaminación atmosférica

asociada en esta área, por lo que surge la necesidad de generar conocimiento específico de modo de colaborar con las autoridades locales en la toma de decisiones tendientes a mejorar el flujo vehicular de forma alineada con algunos de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ONU, 2023).

El presente trabajo, que se enmarca en una línea de investigación multidisciplinar centrada en las relaciones entre movilidad vehicular, contaminación atmosférica asociada y variables climáticas en el ambiente urbano de Bahía Blanca, busca estudiar cómo afecta la movilidad urbana a la calidad de aire de la zona lindante al complejo Alem, ya que en épocas de alta actividad académica es notorio el aumento del flujo vehicular. Cabe mencionar que el área de estudio no cuenta con monitoreo de calidad de aire ni de flujo vehicular, ni estudios previos sobre esta temática.

Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es analizar el impacto de la movilidad urbana sobre la calidad del aire en la zona del complejo Alem de la Universidad Nacional del Sur, mediante la aplicación del modelo de dispersión AERMOD, a fin de generar información relevante que contribuya a una planificación sustentable. En base a ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Realizar un relevamiento inicial de los medios de transporte que circulan en el área de estudio, identificando tipo de

vehículos y flujo vehicular horarios.

- Modelar la dispersión de contaminantes atmosféricos generados por las fuentes móviles estudiadas, utilizando el software AERMOD como herramienta de simulación en ausencia de monitoreo ambiental *in situ*.
- Identificar el impacto de las condiciones meteorológicas locales sobre la distribución de los gases contaminantes prioritarios.

Materiales y Métodos

Este trabajo se enfoca en el modelado de la contaminación atmosférica generada por el tránsito vehicular en un sector estratégico lindante al complejo Alem de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca), a partir de un análisis previo de la segmentación de la flota y del flujo vehicular, incorporando variables climáticas locales propias del ambiente urbano.

Bahía Blanca

La ciudad de Bahía Blanca se localiza en el suroeste de la provincia de Buenos Aires (**Fig. 1 A y B**), dentro del partido homónimo (38° 35' S, 62° 13' O). Se sitúa sobre la Llanura Pampeana, caracterizada por un relieve que varía de plano a levemente ondulado, y se emplaza sobre la margen derecha del estuario de Bahía Blanca, el cual representa la transición entre aguas continentales y marinas (Perillo & Piccolo, 2004).



Figura 1. A. Ubicación del partido de Bahía Blanca en Argentina. Fuente: <http://mapoteca.educ.ar/>. **B.** Ciudad de Bahía Blanca. Fuente: Elaboración propia (Google Maps).

Es una ciudad portuaria con una población de 336.527 habitantes, según el último censo del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INDEC) en 2022, y cuenta con más de 170.000 vehículos (Grassi *et al.*, 2021). Bahía Blanca es una ciudad de tamaño medio, que ha sufrido un crecimiento urbano no planificado, generando mayores niveles de tráfico en el centro de la ciudad (Grassi & Díaz, 2023). El Puerto de Bahía Blanca es una vía estratégica para la salida de la producción de cereales y oleaginosas provenientes de una amplia zona de influencia. A su vez, el complejo portuario se integra con un entorno industrial dinámico: el

Polo Petroquímico de Bahía Blanca. Es uno de los más importantes del país, principalmente por su tamaño y cantidad de empresas instaladas. Entre sus actividades se encuentran la producción de combustibles, plásticos y fertilizantes, así también como el acopio y operación logística de granos y sus derivados. A su vez, este sector productivo se ve potenciado por empresas proveedoras de servicios y soluciones tecnológicas (Bahía Blanca Municipio, 2025).

En cuanto a los aspectos climáticos, Bahía Blanca se localiza en la franja de climas templados, con veranos e inviernos bien diferenciados y primaveras y otoños moderados (Capelli de Steffens *et al.*, 2005). Las temperaturas más altas, las lluvias más intensas y los vientos más fuertes se registran principalmente en primavera y verano. La circulación atmosférica regional imprime para la ciudad características continentales, a pesar de su posición costera (Capelli de Steffens *et al.*, 2005). Según el Servicio Meteorológico Nacional (SMN) en el período 1991-2020 la temperatura media anual fue de 15,4 °C, con precipitaciones que rondan los 585 mm medios anuales y vientos dominantes provenientes del norte, noroeste y oeste.

Es sabido que el proceso de urbanización produce cambios importantes en la naturaleza de la superficie y, por lo tanto, en las condiciones atmosféricas locales. En este

sentido, Bahía Blanca no ha sido la excepción y ya desde 1985 se realizaron estudios para identificar la isla de calor urbana en la ciudad (Capelli de Steffens *et al.*, 2005). Estudios recientes han evidenciado el impacto del crecimiento urbano sobre el clima local (Ferrelli, 2017; Ferrelli & Piccolo, 2017). Fernández *et al.* (2021) demostraron que en las áreas centrales predominan los flujos de calor sensible, antropogénico y de almacenamiento, a diferencia de las zonas periurbanas y costeras, donde domina el flujo de calor latente. Asimismo, Fernández *et al.* (2025) mostraron que la morfología urbana condiciona la distribución vertical de temperatura y humedad en cañones urbanos centrales, favoreciendo la formación de inversiones térmicas nocturnas al interior de los mismos bajo condiciones de cielo despejado y vientos débiles. Estas condiciones estructurales exacerban el efecto de isla de calor urbano y potencian el efecto de eventos térmicos extremos, como las olas de calor. De hecho, estudios precedentes verificaron el mayor impacto de eventos térmicos extremos en áreas centrales de la ciudad y su efecto en la calidad del aire (Gentili & Fernández, 2023; Gentili & Fernández, 2025).

La UNS es la mayor universidad nacional del sur de la provincia de Buenos Aires (CIC, 2024), cuya estructura es departamental y cuenta con dos grandes campus. El primero es el complejo ubicado en la avenida Alem 1253 (**Fig. 2**), zona de alta circulación

vehicular, que data de la década del 60, en el cual funcionan la mayoría de los laboratorios, así como también la Biblioteca Central y algunas unidades académicas. La universidad también cuenta con el campus Palihue (San Andrés 800), zona residencial del macrocentro, donde desarrollan sus actividades el resto de los Departamentos y tiene la mayor proyección de expansión debido a la disponibilidad de espacio. Los principales horarios en los que se desarrollan las clases en la universidad son de lunes a viernes de 8 a 22 h. Además, hay otros horarios como, por ejemplo, para la sala de lectura que se encuentra abierta de lunes a viernes de 7 a 24 h y sábados, domingos y feriados de 8 a 22 h. Actualmente, la actividad del Rectorado y sus Secretarías, junto a otras dependencias administrativas, se encuentran en la avenida Colón 80, edificio que supo ser la sede central de la universidad (UNS, 2025).



Figura 2. Complejo de la UNS ubicado en avenida Alem 1253. Fuente:

<https://infoecos.com.ar/index.php/la-universidad-nacional-del-sur-con-sede-en-bahia-blanca-entre-las-10-mejores-del-pais/>.

Área de estudio

El contexto de realización de este trabajo, está ubicado en el complejo Alem, zona denominada “sector universitario de la ciudad de Bahía Blanca”, también conocida como Barrio Universitario. Este sector cuenta con una gran oferta de departamentos y servicios destinados a estudiantes universitarios. Además, la avenida Alem es una importante arteria de comunicación de doble sentido, entre el centro de la ciudad y barrios de la periferia (Alem 4000, ver **Fig. 4**). Lindante al complejo Alem, se encuentra el Parque de Mayo (**Fig. 3**), uno de los espacios verdes más importantes de la ciudad con más de 60 hectáreas forestadas (Bahía Blanca Municipio, 2025). Concretamente, se eligió estudiar esta zona, ya que nunca fue relevada desde el punto de vista de la

movilidad ni de la contaminación atmosférica asociada, a pesar de ser un sector de muy alta circulación y de relevancia para la comunidad universitaria.



Figura 3. La Arcada, acceso al Parque de Mayo lindante a la UNS. Fuente: Fotografía propia.

En particular, la zona de estudio posee una climatología influenciada por las condiciones de sitio asociadas a la presencia del Parque de Mayo, caracterizado por una cobertura



Figura 4. Situación a la fecha 09/08/2023 de las ciclovías (anaranjado) en el sector lindante a la UNS, complejo Alem, sobre Av. Alem 1253, y ubicación de las dos esquinas seleccionadas: Alem-Córdoba, y Córdoba-Agustín Álvarez (flechas rojas). Fuente: Elaboración propia con datos de Google Earth.

arbórea variable, pequeños arbustos y extensas superficies de espacios abiertos cubiertos por césped. Según la zonificación climática realizada para la ciudad de Bahía Blanca por Fernández *et al.* (2021) en base a la metodología propuesta por Stewart y Oke (2012), el sitio pertenece a una categoría mixta entre Zona Climática Local B y Zona Climática Local D que se caracterizan por árboles dispersos o en pequeños grupos combinados con una cubierta continua de vegetación baja, lo que produce un sombreado intermitente y una alta evapotranspiración que moderan los picos térmicos diurnos y favorecen la disipación rápida del calor acumulado (Oke *et al.*, 2017).

Para la selección de las esquinas a estudiar, se realizó un análisis de la situación actual de la distribución de ciclovías en el sector de interés, recorriendo la zona y relevando los sectores que contaban con ciclovías en ese momento. Esta actividad se realizó el día 9 de agosto de 2023. La distribución de ciclovías resultante se puede observar en la **figura 4**. El objetivo de este relevamiento, que está comprendido dentro de una línea de investigación más amplia, se centró en seleccionar esquinas en las que se pueda proyectar la construcción de nuevas ciclovías que estén conectadas con las actuales, y entonces poder comparar el flujo vehicular y la emisión asociada, antes y después de su emplazamiento.

Por otra parte, las dos esquinas seleccionadas debían tener una cercanía importante a la UNS, complejo Alem. Teniendo en cuenta esto, se seleccionaron las esquinas de Avenida Alem-Córdoba y Córdoba-Agustín Álvarez (**Fig. 4**). Finalmente, en el período en que se realizó este trabajo, no se implementaron ninguna de las ciclovías proyectadas por la Municipalidad de Bahía Blanca en 2015 (MBB/UTN FRBB, 2015) para este sector.

Obtención de datos de movilidad urbana

Los criterios correspondientes a la caracterización general de la flota vehicular en la ciudad y a la selección de contaminantes a modelar, fueron extraídos de estudios anteriores en el marco de la línea de investigación, específicamente del inventario de emisiones gaseosas provenientes de fuentes móviles para el año 2018 para la ciudad de Bahía Blanca (Grassi *et al.*, 2021). En base a estos estudios, para este trabajo se seleccionó la siguiente segmentación vehicular: automóviles, motocicletas, camionetas tipo pick up, transporte de carga liviana (combis, camiones de reparto), colectivos y bicicletas. El microvehículo eléctrico no se consideró debido a la baja aparición. Cabe destacar que no transitan vehículos de gran porte, como camiones, por esta zona, ya que tienen prohibido el acceso. Los peatones también se contabilizaron, aunque fueron tomados como datos estimativos debido a la dificultad para

realizar su conteo y variabilidad en los valores obtenidos.

De la contribución de cada contaminante a las emisiones totales provenientes de fuentes móviles, en el período de estudio abordado por Grassi *et al.* (2021), se pudo observar que la máxima participación corresponde al monóxido de carbono (CO), con el 70,57%, seguido por los óxidos de nitrógeno (NOx) (22,28%), los Compuestos Orgánicos Volátiles No Metano (NMVOCs, por sus siglas en inglés) (7,13%) y el dióxido de azufre (SO₂) (0,01%). Consecuentemente, para la realización del relevamiento de datos con filmaciones *in situ* en los puntos de interés específicos y el posterior modelado, se tuvieron en cuenta el CO y los NOx como contaminantes criterio.

Las filmaciones se efectuaron en las esquinas seleccionadas, un día hábil por semana, de lunes a viernes, durante el horario pico del mediodía (de 12 a 13 h), en el período comprendido entre septiembre de 2023 y agosto de 2024. Se utilizaron videos de 15 minutos grabados con un celular Samsung Galaxy A23, con resolución HD (1920 × 1080 píxeles). El material registrado permitió una visión completa del cruce en cada intersección, con condiciones climáticas controladas (se evitó grabar en días de lluvia o en fechas festivas cercanas). El conteo se realizó de forma manual en planillas de Excel a partir de la observación directa del material filmico implementando la segmentación estipulada.

Para una representación precisa del flujo, se dividió cada cruce en varios tramos (**Fig. 5**), con identificación de sentido de circulación y



Figura 5. Ubicación de cada tramo de calle de las esquinas Alem-Córdoba y Córdoba-Agustín Álvarez utilizado para el proceso de obtención de datos de movilidad urbana. Fuente: Elaboración propia.

especificaciones físicas (largo y ancho, **tabla 1**) obtenidas mediante Google Earth y validadas *in situ*. Esta segmentación permitió calcular las tasas de emisión requeridas por AERMOD, a partir del flujo horario estimado, las dimensiones de las calles y los factores de emisión provistos por el Handbook Emission Factors for Road Transport (HBEFA). Las tasas se calcularon para cada categoría vehicular, tramo, semana y contaminante (CO y NO_x).

Tramo	1	2	3	4	5	6	7
Largo (m)	70,6	211,5	223,0	65,5	114,0	71,7	105,0
Ancho (m)	17,0	17,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0

Tabla 1. Largo y ancho en metros de cada tramo de calle analizado para las esquinas Alem-Córdoba y Córdoba-Agustín Álvarez, mostrados en Fig. 5.

El relevamiento se extendió durante 47 semanas. Algunas de ellas requirieron doble jornada de filmación por condiciones meteorológicas o cuestiones logísticas. La semana S15 quedó excluida por el fuerte temporal que afectó Bahía Blanca en diciembre de 2023, mientras que las semanas S17, S20, S21 y S35 fueron consideradas outliers en el análisis. Esta base de datos permitió generar una caracterización detallada de la dinámica vehicular en el área universitaria, indispensable para alimentar el modelo de dispersión de contaminantes y analizar la calidad del aire en este sector específico de la ciudad.

Caracterización microclimática del área de estudio

La caracterización climática del sitio se basó en datos de temperatura y humedad correspondientes a la Red Urbana de Monitoreo Meteorológico (RUMM), una red de sensores en expansión instalada en diversos sectores de la ciudad. Se cuenta con datos de dos sensores ubicados en proximidades del sitio de modelado (dentro del Parque de Mayo) a 1,5 m (BBUP_S) y 4 m de altura (BBUP_H). Además, a fines de comparar dicha distribución higrótérmica con otros sectores de la ciudad, se utilizaron datos de un sensor ubicado en el microcentro urbano (BBD_S), caracterizado por una alta compacidad edilicia. El sensor se localiza en la calle O'Higgins en proximidades de su intersección con calle Brown a 2,5 m de altura. Por otra parte, se analizaron datos provistos por el SMN correspondientes a la estación meteorológica oficial de la ciudad localizada en el aeropuerto local (BBA). Este último se considera representativo de las condiciones meteorológicas regionales. El análisis se realizó en dos escalas temporales específicas. En primer lugar, un período de 32 meses de registro meteorológico continuo, con el objetivo de caracterizar el perfil higrótérmico del sitio de modelado en relación con las otras estaciones (BBA y BBD_S). En segundo lugar, la distribución de la temperatura y la humedad en BBUP_S y BBUP_H durante los días seleccionados para el modelado de contaminantes, con especial

atención a la evolución del gradiente térmico en la noche precedente a los días de mayores concentraciones modeladas de NO_x y CO. Estos datos son relevantes ya que los contaminantes tienden a acumularse en los periodos de estabilidad atmosférica y vientos de baja intensidad, condiciones que son características de las noches y madrugadas de invierno. Esta información serviría para generar hipótesis de acumulación de contaminantes, ya que, si bien la hora modelada corresponde solo al mediodía, se podría esperar que la concentración real fuera mayor, si hubo estabilidad y bajo viento durante las 15 horas anteriores. Por lo tanto, se analizaron los registros térmicos previos al horario de modelado — a las 21:00 h del día anterior y a las 00:00 h, 03:00 h, 06:00 h, 09:00 h y 12:00 h del mismo día—.

Implementación del Modelo de Dispersión (software AERMOD View)

El software AERMOD View, desarrollado por la empresa Lakes Environmental Inc. de Canadá, es uno de los modelos recomendados por la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (USEPA) para evaluaciones ambientales de proyectos (Silva & Arcos, 2011). Cuenta con dos procesadores de datos de entrada que son componentes reguladores del sistema de modelado AERMOD: AERMET, un preprocesador de datos meteorológicos, y AERMAP, un preprocesador de datos de terreno. Se debe realizar una corrida por

semana, por contaminante (NO_x y CO) y por esquina. La información para la utilización del software fue extraída del Manual de uso de AERMOD View (USEPA, 2019).

Un aspecto importante a mencionar de la aplicación del modelado, es la meteorología. Para modelar correctamente la dispersión de emisiones gaseosas, se requieren datos meteorológicos del área bajo investigación. Estos datos se tomaron de la base de datos de la Oficina Nacional de Administración Oceánica y Atmosférica (National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA) para la estación 87750 en los años 2023 y 2024. Utilizando esta base, se crearon los archivos meteorológicos necesarios para ingresar a AERMOD mediante el preprocesador AERMET, que calcula dos tipos de documentos de entrada: uno que contiene observaciones superficiales por hora y otro con datos del sondeo del aire superior.

Debido a que algunos valores no estaban disponibles en la base de datos, fue necesario reemplazarlos por datos correspondientes a días cercanos, con condiciones meteorológicas similares y en horarios contiguos, tomados de la misma base de datos. Estos casos corresponden a las semanas S3, S4, S6, S9, S10, S12, S13, S14, S19 y S45. Finalmente, se ingresaron los archivos meteorológicos de entrada en AERMOD. Debido a que los fenómenos meteorológicos ejercen un impacto significativo en la dispersión de

contaminantes, resulta esencial realizar un análisis detallado de las condiciones meteorológicas. Es importante destacar que condiciones adversas, como los vientos calmos (inferiores a 0,5 m/s) y la estabilidad atmosférica, tienen el potencial de generar días de acumulación de contaminantes, incluso en presencia de niveles bajos de emisiones.

Una vez cargados todos los datos de entrada, se procede a correr el modelo. Completada la simulación, se despliega un informe de salida donde se detalla toda la información referida al modelado. A su vez, en la pantalla principal de AERMOD se visualiza un gráfico en donde se pueden distinguir las concentraciones del contaminante en cuestión (NO_x o CO) en los diferentes puntos de la grilla polar de receptores ubicada en la zona de estudio. Este gráfico puede ser exportado a Google Earth seleccionando el botón “3D View”, para poder visualizar la grilla sobre un mapa real del área de estudio.

Resultados y Discusión

Datos de movilidad urbana

A partir del conteo manual, se identificaron 46779 vehículos en 1380 minutos de grabación (92 videos de 15 minutos cada uno). La segmentación promedio para ambas esquinas mostró una fuerte predominancia del automóvil (70–71 %), seguido por camionetas (10–11 %) y motocicletas (8–12 %). Las bicicletas representaron entre un 4 % y 5 %, mientras que el transporte de

carga liviana tuvo una participación del 3–4 %. No se registró circulación de colectivos en Córdoba-Agustín Álvarez, porque ninguna línea transita por ese sector.

En términos de flujo vehicular, los valores máximos se observaron en la avenida Alem, alcanzando 1414 veh/h (S12 - 23/11/2023) y un promedio mensual de hasta 1325 veh/h en diciembre 2023. En contraste, Agustín Álvarez registró los valores más bajos, con mínimos de 34 veh/h (S42 – 25/07/2024). El análisis mensual mostró caídas marcadas en enero y julio de 2024, coincidentes con los recesos universitarios. El tramo Córdoba-Agustín Álvarez, en particular, presentó flujos menores y más estables, con valores máximos de 346 veh/h (S47 – 29/08/2024).

En cuanto a movilidad activa, la mayoría de los ciclistas circularon por la calle, aunque en la intersección Alem-Córdoba se observó un mayor uso de veredas, posiblemente por el mayor congestionamiento vehicular. En el tramo 7 (único con ciclo vía), todas las bicicletas circularon por ella.

Caracterización higrotérmica en torno al sitio de análisis

La **figura 6** muestra la distribución térmica media horaria de los sitios de monitoreo de variables meteorológicas, para 32 meses de registro correspondiente a BBA, BBUP_S y BBD_S. Puede observarse que, para todas las horas del día, la estación localizada en el periurbano (BBA) presenta los menores valores térmicos. BBUP_S, superficial del

Parque de Mayo, presenta menores valores que la estación situada en el microcentro de la ciudad (BBD_S), dejando de manifiesto la influencia de la cobertura arbórea y arbustiva en las temperaturas dentro de la ciudad, en este caso el parque. Las diferencias más notorias entre BBD_S y BBUP_S se registran durante las horas centrales del día (11:00–17:00 h), cuando el sector de mayor densidad urbana conserva temperaturas más elevadas. Entre las 08:00 y las 12:00 h, BBUP_S presenta un ascenso térmico más rápido debido a su menor inercia térmica, asociada al predominio de vegetación y superficies permeables, que favorecen un enfriamiento nocturno más intenso y una respuesta más inmediata a la radiación solar. En contraste, BBD_S, con alta densidad edilicia y superficies impermeables, retiene calor durante la noche y modera el ritmo de calentamiento, prolongando temperaturas elevadas a lo largo del día.

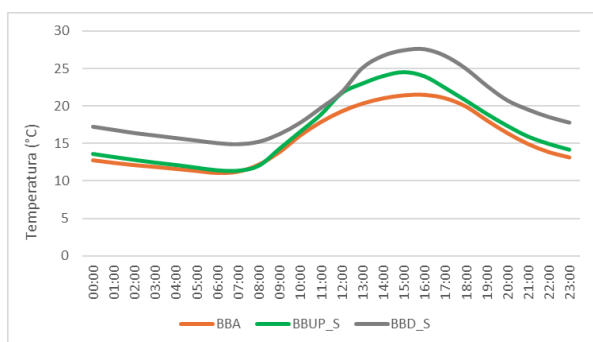


Figura 6. Distribución media diaria de la temperatura en Bahía Blanca para 32 meses de registros en estaciones BBA (Aeropuerto Bahía Blanca -periurbano-), BBUP_S (Parque de Mayo) y BBD_S (microcentro).

Modelado de emisiones de NOx y CO (software AERMOD)

Como se mencionó en la metodología, se llevó a cabo una corrida por semana, por contaminante y por esquina. De todo el modelado, se pondrá foco en los peores escenarios, es decir, las concentraciones máximas obtenidas para cada día. En las **figuras 7 A y B** se exponen los valores obtenidos en cada semana y para cada contaminante, en las esquinas de Alem-Córdoba y Córdoba-Agustín Álvarez respectivamente. En las mismas se muestran los valores máximos obtenidos para cada caso.

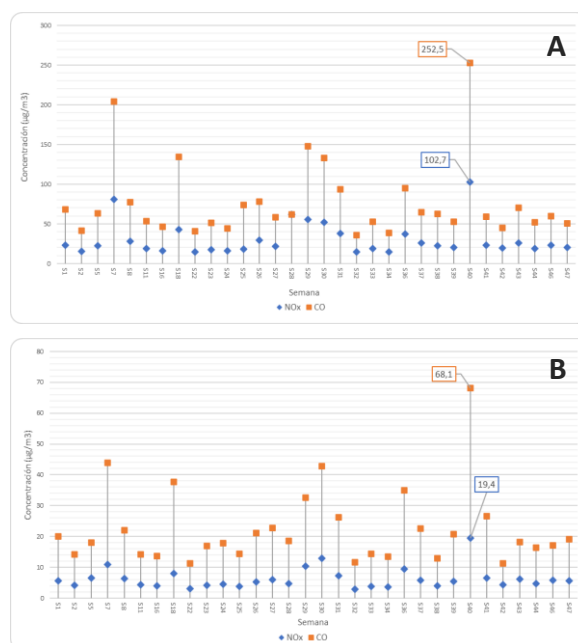


Figura 7. Concentraciones de NOx y CO ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) por semana para la intersección avenida Alem-Córdoba (A) Córdoba-Agustín Álvarez (B) obtenidas del modelado con el software AERMOD.

Las concentraciones máximas obtenidas para la intersección Alem-Córdoba fueron $102,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de NOx y $252,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de CO;

mientras que para la intersección Córdoba-Agustín Álvarez fueron $19,4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de NO_x y $68,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de CO. Al alejarse solamente una cuadra de la universidad, los aportes de NO_x disminuyeron un 81,2% y los de CO un 72,7%, comparando los valores máximos de cada intersección.

Como ya se mencionó anteriormente, la situación de la atmósfera determina el estado y movimiento de las masas de aire, lo que, a su vez, facilita o dificulta la dispersión de la contaminación. La estabilidad atmosférica, la velocidad del viento (a menor velocidad, menor dispersión de los contaminantes), la alta insolación (favorece las reacciones de los contaminantes primarios, aumentando la concentración de contaminantes secundarios), entre otros factores, pueden provocar altos niveles de concentración de contaminantes aún en días de bajas emisiones (Kiely, 1999; Wang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). En concordancia con esto, todos los valores máximos se dieron el día 11/07/2024 (S40), día en el que las condiciones atmosféricas coincidían con un panorama de vientos bajos de 1,5 m/s a las 12 h (SMN), lo que podría explicar estos resultados. Según los datos tratados con el software AERMET, para el año 2023 los vientos con velocidades menores a 1,5 m/s entran en una clase con una frecuencia de solo el 4,1%, por lo que no es una condición atmosférica habitual en el área de estudio. Además, es importante aclarar que los flujos totales en S40 no fueron altos comparados

con el resto de las semanas, por lo que se puede decir que estos valores máximos de concentraciones están determinados en mayor medida por las condiciones atmosféricas. Por este motivo, se procede a evaluar las condiciones locales, específicas del sector. El análisis de los registros térmicos previos al horario de modelado mostró que, en siete de los once días con las concentraciones máximas de contaminantes, BBUP_S presentó temperaturas inferiores a las de BBUP_H en al menos cinco de esos registros analizados. Esto indica la ocurrencia de un alto porcentaje de gradiente térmico vertical estable en el sitio de estudio durante las horas nocturnas, que podría estar provocando condiciones propicias para la acumulación de contaminantes. En cuanto al análisis de las velocidades medias de viento en dichos horarios mostró que en diez de los once días de máximas concentraciones modeladas el viento medio fue menor o igual a 8,1 m/s y en tres de esos once días, se registraron velocidades medias menores o iguales a 3,9 m/s. Cabe señalar que el día de máximas concentraciones modeladas, el viento medio registrado en las horas previas al mediodía fue de 3,9 m/s. Estas condiciones locales, refuerzan la hipótesis de acumulación de contaminantes, por lo que se esperaría que los valores máximos de contaminantes modelados, fueran aún mayor si consideramos que la alta circulación vehicular se observa desde horas muy tempranas del día.

Las **figuras 8 A y B** presentan los resultados del modelado realizado con AERMOD View para el día en que se registraron los valores máximos de emisiones (S40 – 11/07/2024), representados espacialmente mediante su exportación a Google Earth. En estas imágenes se observa la contribución de contaminantes emitidos por fuentes móviles en ambas intersecciones dentro del área de estudio. Los valores máximos reflejados corresponden a las emisiones generadas en ambas intersecciones (Alem-Córdoba y Córdoba-Agustín Álvarez), por lo que resultan superiores a los valores presentados previamente para cada punto por separado. Esta representación permite visualizar la influencia relativa de cada intersección y comprender de manera integral el comportamiento de las emisiones en toda el área analizada.

En la parte central derecha de ambas figuras, se puede observar la UNS (complejo Alem) y en la parte superior, la Arcada y el Parque de Mayo. En la **figura 8A** se muestran los niveles de concentración de NOx [$\mu\text{g}/\text{m}^3$] y, en la **figura 8B**, los niveles de concentración de CO [$\mu\text{g}/\text{m}^3$], en un período de 1 hora considerando el aporte de emisiones de ambas intersecciones avenida Alem-Córdoba y Córdoba-Agustín Álvarez. Además, se puede observar la dirección del viento proveniente del Sudoeste que arrastra los contaminantes hacia el Noreste, a pesar de ser de baja velocidad. La dinámica de todos los gráficos es muy similar, claramente el

aporte de ambos contaminantes es bastante mayor en Alem-Córdoba que en Córdoba-Agustín Álvarez, siendo la avenida Alem la arteria en la que se detectan los valores de concentración más elevados. Esto se debe a que el flujo vehicular, en general, es mucho mayor en Alem-Córdoba (especialmente en la avenida Alem) que en la otra intersección. Una distinción entre los contaminantes radica en que, en general, las concentraciones de CO son considerablemente más altas que las de NOx.

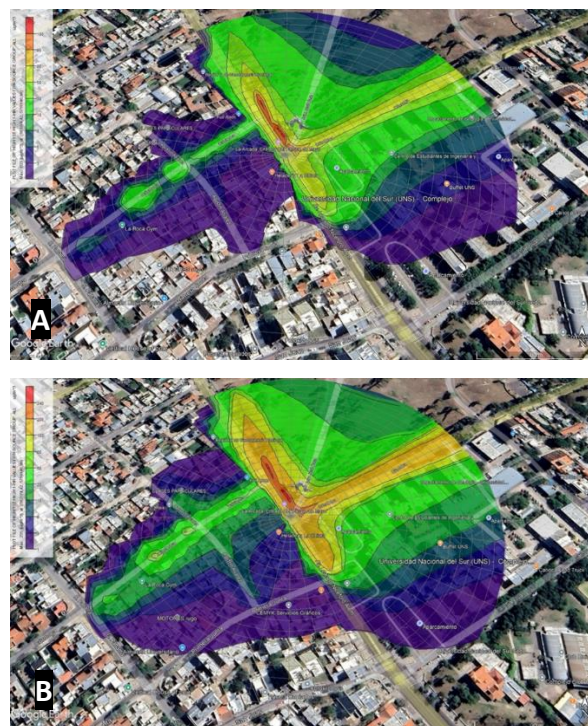


Figura 8. Gráfica de concentraciones (S40) de NOx (A) y CO (B) en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para período de 1 hora en las intersecciones Alem-Córdoba y Córdoba-Agustín Álvarez obtenidas a través del modelado con el software AERMOD. Fuente: Elaboración propia/Google Earth.

Teniendo en cuenta los aportes de ambas intersecciones, el modelado arrojó los siguientes valores máximos: 103,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

para NO_x y 255,0 µg/m³ para CO. La **tabla 2** resume los valores obtenidos para cada intersección de manera individual y de forma agrupada. Se puede observar que si se sumaran individualmente los máximos de cada intersección se obtendrían valores mayores que los que calculó AERMOD en este caso, lo que sugiere que el modelado del área de estudio en general no es una simple suma lineal (Cimorelli *et al.*, 2005), sino que tiene en cuenta la interacción entre las plumas y las características del entorno (dispersión, dilución atmosférica, topografía, condiciones meteorológicas, etc.).

Considerando una conversión directa de NO_x a NO₂ (Tier 1) y tomando los Índices de Calidad de Aire internacionales (ICA ó AQI por sus siglas en inglés), nuestra concentración máxima de 103,4 µg/m³ representa un valor de ICA aproximado de 55, que corresponde a la categoría amarilla (nivel de calidad de aire moderado). Esta categoría implica un riesgo leve para personas inusualmente sensibles, recomendando considerar limitar el esfuerzo prolongado al aire libre, especialmente cerca de calles muy transitadas (USEPA, 2024).

En función de estos valores máximos (escenario más desfavorable), se procede a compararlos con la legislación vigente. Como ya se mencionó en el marco teórico, en la Provincia de Buenos Aires los niveles guía de NO_x y CO se encuentran regulados en la Tabla A/Anexo III ("Valores Norma para los

Estándares en Calidad de Aire") del Decreto 1074/2018 reglamentario de la Ley 5965 de "Protección a las fuentes de provisión y a los cursos y cuerpos receptores de agua y a la atmósfera". Los valores norma para períodos de 1 hora de exposición en condiciones estándar de estos contaminantes son: NO₂: 188 µg/m³; CO: 40000 µg/m³. Ninguno de los valores máximos supera los límites, siendo estos muy inferiores (representan un 55% - NO₂- y un 0,6% -CO-) como se observa en la **tabla 2**.

Área modelada	CO [µg/m ³]	NO _x [µg/m ³]	Fecha
Alem-Córdoba	252,5	102,7	11/07/2024
Córdoba-A. Álvarez	68,1	19,4	11/07/2024
Ambas intersecciones	255,0	103,4	11/07/2024
Legislación	40000,0	188,0 (NO ₂)	
Brown y Fitz Roy	246,2	61,6	06/07/2021
Estomba y Roca	203,6	64,1	10/05/2022 06/07/2021
Sarmiento y Zelarrayán	251,4	68,9	06/07/2021 10/05/2022

Tabla 2. Concentraciones máximas modeladas de CO y NO_x, en µg/m³, para las intersecciones estudiadas de manera individual y en conjunto, en la semana S40. Se incluye el valor límite establecido por el Dec. 1074/2018 de la Prov. de Buenos Aires, y los valores máximos modelados en el microcentro de la ciudad, para su comparación.

Por último, resulta interesante comparar los resultados obtenidos en este estudio, con los derivados del trabajo de Grassi & Díaz (2024) realizado en el microcentro de Bahía Blanca durante el periodo julio 2020 – junio 2022, también en horario pico del mediodía. La

tabla 2 detalla los valores máximos de concentración de CO y NOx para cada intersección del microcentro analizada y las del presente estudio. Los resultados obtenidos para el microcentro están en un orden similar al de la intersección Alem-Córdoba, principalmente los de CO, lo cual es coherente porque son áreas con altos volúmenes de tráfico vehicular. Además, se debe destacar que al igual que lo reportado en el presente trabajo, las máximas concentraciones obtenidas para el microcentro coincidieron con días de baja velocidad de viento, y no con los días de máximo flujo vehicular.

Conclusiones

La movilidad urbana es esencial para el normal desarrollo de las actividades diarias de una ciudad. Sin embargo, conlleva efectos negativos como la contaminación del aire y la congestión. Es por ello que este estudio se enfocó en el análisis del impacto del tránsito vehicular sobre la calidad del aire en la zona del complejo Alem de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca). A partir de los resultados presentados y la discusión de los mismos, se arriban a varias conclusiones.

En primer lugar, mediante el relevamiento de tránsito, se detectó en el área de estudio una fuerte predominancia de automóviles (~70,5%), y la Avenida Alem mostró los mayores flujos vehiculares, alcanzando picos de 1414 vehículos por hora (veh/h). Se observaron disminuciones marcadas en el

flujo vehicular durante los recesos universitarios (enero y julio de 2024), lo que sugiere una clara relación entre la actividad académica y el tráfico en la zona.

Las concentraciones de contaminantes máximas modeladas para la intersección de Avenida Alem-Córdoba fueron de 252,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de CO y 102,7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de NOx. En la intersección de Córdoba-Agustín Álvarez, estos valores fueron notablemente inferiores (68,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de CO y 19,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de NOx), indicando una reducción significativa (72,7% para CO y 81,2% para NOx) al alejarse tan solo una cuadra de la universidad, en relación directa con el menor flujo vehicular.

Al realizar los modelados de dispersión de contaminantes con AERMOD, se pudo observar que las condiciones meteorológicas son el factor más determinante en los picos de concentración, incluso más que el volumen de tráfico, siendo los vientos suaves lo que más afecta a la dispersión. Asociado a esto, se destaca que los valores máximos de concentración de CO y NOx se registraron el 11 de julio de 2024 (semana S40), un día caracterizado por velocidades de vientos bajos, a pesar de no ser el día de mayor flujo vehicular. Según mediciones de variables meteorológicas locales, en ubicación muy cercana del sector estudiado, se puede ver que los días de mayor concentración de contaminantes hubo inversiones de temperaturas en las 15 horas precedentes, lo que refuerza la hipótesis de acumulación de

contaminantes. Debido a esto se esperaría que el valor real de estos días fuera aun mayor que el modelado, ya que el alto tránsito en el sector se observa desde horas tempranas de la mañana.

Es importante resaltar que los valores máximos de contaminantes obtenidos no superan los límites establecidos por la legislación vigente en la Provincia de Buenos Aires (Decreto 1074/2018). No obstante, según el ICA, el NO₂ máximo corresponde a la categoría amarilla (nivel de calidad de aire moderado). Esta categoría implica un riesgo leve para personas inusualmente sensibles. Por lo tanto, no se esperan episodios de alerta o peligro para la salud humana en general.

También, se puede concluir que las concentraciones en la intersección de Avenida Alem-Córdoba son similares a las registradas en el microcentro de Bahía Blanca, lo cual es coherente dado los altos volúmenes de tráfico en ambas áreas.

La falta de estudios previos sobre movilidad y contaminación atmosférica en esta área de alta circulación y relevancia universitaria hace que este trabajo sea de gran interés. Los datos generados, especialmente el relevamiento detallado del flujo vehicular y los resultados del modelado de calidad de aire, contribuyen a la planificación sustentable y a la toma de decisiones por parte de las autoridades locales para mejorar

tanto el flujo vehicular como la calidad del aire del área de estudio.

Financiamiento

PGI UNS 2024-2027. Código: 24/M179. Directora: Dra. Mónica F. Díaz. Ejecuta: PLAPIQUI (UNS-CONICET).

PIP 2022-2025. Código: 11220210100683CO. Directora: Dra. Mónica F. Díaz. Ejecuta: PLAPIQUI (UNS CONICET).

PGI UNS 2024-2027. Código: 24/ZG33. Dirección: Dr. Jorge Gentili. Co-dirección: Dra. María Eugenia Fernández. Financiamiento: Secretaría General de Ciencia y Tecnología, UNS.

PIP 2021 - continua. Código: 11220200100032. Dirección: Dr. Jorge Gentili. Financiamiento: CONICET

Referencias bibliográficas

Bahía Blanca Municipio. (Accesada en julio 2025). <https://www.bahia.gob.ar>

Capelli de Steffens, A., Piccolo, M., & Campo de Ferreras, A. (2005). Clima urbano de Bahía Blanca. Dunken. Buenos Aires.

CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires). (Accesada en marzo 2024). Universidad Nacional del Sur.

<https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/192>

Cimorelli, A., Perry, S., Venkatram, A., Weil, J., Paine, R., Wilson, R., Lee R., & Brode, R.

- (2005). AERMOD: Un modelo de dispersión para aplicaciones de fuentes industriales. Parte I: Formulación general del modelo y caracterización de la capa límite. *Revista de Meteorología Aplicada*, 44, 682–693.
- Fernández, M., Gentili, J., & Lopez, M. (2025). The influence of urban morphology and meteorological factors on vertical thermohygrometric distributions in a mid-sized Latin American city. *Environmental Processes*, 12, 1–27. doi:10.1007/s40710-025-00745-7
- Fernández, M., Picone, N., Gentili, J., & Campo, A. (2021). Analysis of the Urban Energy Balance in Bahía Blanca (Argentina). *Urban Climate*, 37, 100856. doi:10.1016/j.uclim.2021.100856
- Fernández, M., Picone, N., Gentili, J., & Campo, A. (2021). Analysis of the Urban Energy Balance in Bahía Blanca (Argentina). *Urban Climate*, 37, 100856. doi:10.1016/j.uclim.2021.100856
- Ferrelli, F. (2017). Análisis del clima local y micro-local de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. *Geográfica Digital*, 13, 1–6.
- Ferrelli, F., & Piccolo, M. (2017). Estudio del confort climático a escala micro-local: El caso de Bahía Blanca (Argentina). *Bitácora Urbano Territorial*, 27, 91–100. doi:10.15446/bitacora.v27n3.56995
- Gentili, J., & Fernández, M. (2023). Influencia de la forma y función urbana en la intensidad de las noches tropicales y las noches tórridas en Bahía Blanca (República Argentina). *Contribuciones Científicas GAEA*, 35, 26–36.
- Gentili, J., & Fernández, M. (2025). Eventos de calor extremo en una ciudad suramericana de clima templado: El caso de Bahía Blanca (Argentina). *Estudios Geográficos*, (en prensa).
- Gentili, J., Fernández, M. & Gil, V. (2020). Influence of Topography on Local Atmospheric Features in a Peri-urban Area of Bahía Blanca (Argentina). *Environmental Processes*, 7, 23–40. doi:10.1007/s40710-019-00408-4
- Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. (2018). Decreto 1074/2018 reglamentario de la Ley 5965 de “Protección a las fuentes de provisión y a los cursos y cuerpos receptores de agua y a la atmósfera”. <https://normas.gba.gob.ar/documentos/0zWjvSXx.pdf>
- Grassi, Y., & Díaz, M. (2023). Post-pandemic urban mobility in a medium-sized Latin American city: Is sustainable micro-mobility gaining ground?. *International Journal of Environmental Studies*. doi:10.1080/00207233.2023.2195327
- Grassi, Y., Díaz, M. (2024). Urban air pollution evaluation in downtown streets of a medium-sized Latin American city using AERMOD dispersion model. *Environmental Monitoring and Assessment*. doi:10.1007/s10661-024-12699-8

Grassi, Y., Brignole, N., & Díaz, M. (2021). Vehicular fleet characterisation and assessment of the on-road mobile source emission inventory of a Latin American intermediate city. *Science of The Total Environment*, Volume 792, 148255. ISSN 0048-9697.

doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148255

Handbook Emission Factors for Road Transport (HBEFA). (Accesada en diciembre 2023).

<https://www.hbefa.net/en/software#online-version>

Kiely, G. (1999). Ingeniería ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. Mcgraw-hill / Interamericana de España, S.A. Madrid, España. ISBN: 9788448120399.

Lakes Environmental Software. (2023). AERMOD VIEW. Gaussian Plume Air Dispersion Model.

<https://www.weblakes.com/software/air-dispersion/aermოდ-view/>

Miskolczi, M., Földes, D., Munkácsy, A., & Jászberényi, M. (2021). Urban mobility scenarios until the 2030s. *Sustainable Cities and Society*, 72, 103029. doi:10.1016/j.scs.2021.103029

Municipio de Bahía Blanca / Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Bahía Blanca. (2015). Ciclovías – MBB 2015. <http://www.bahiablanca.gov.ar/wp->

[content/uploads/2015/07/3.-Informe-Tecnico-UTN-Web.pdf](#)

National Centers for Environmental Information (NOAA). (2018). Federal climate complex data documentation for integrated surface data (ISD). Asheville, NC, USA.

Oke, T., Mills, G., Christen, A., & Voogt, J. (2017). *Urban Climates*. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN: 978-1-107-42953-6

ONU - Organización de las Naciones Unidas. (2023). Sustainable Development Goals. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/>

Perillo, G., & Piccolo, M. (2004). ¿Qué es el estuario de Bahía Blanca?. *Ciencia Hoy*, 14(81), 8–15. ISSN : 0327-1218.

Servicio Meteorológico Nacional (SMN). (Accesado en febrero de 2024). Descarga de Datos Diarios. <https://www.smn.gob.ar/descarga-de-datos>

Silva, A. & Arcos, D. (2011). Aplicación del programa AERMOD para modelar dispersión de PM10 emitido por equipos de calefacción a leña en la ciudad de Constitución. *Obras y Proyectos* 9, 4-10. ISSN 0718-2813. doi:10.4067/S0718-28132011000100001

Stewart, I., & Oke, T. (2012). Local climate zones for urban temperature studies. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 93(12), 1880–1900. doi:10.1175/BAMS-D-11-00019.1

- Sultana, S., Salon, D. & Kuby, M. (2017). Transportation sustainability in the urban context: a comprehensive review. Urban Geography, vol. 40, no. 3, pp. 279-308, 2017. doi:10.1080/02723638.2017.1395635
- Gulia, S., Nagendra, S., Khare, M., & Khanna, I. (2015). Urban air quality management—A review. Atmospheric Pollution Research, 6(2), 286–304. doi:10.5094/APR.2015.033
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2005). Revisiones a la Guía sobre Modelos de Calidad del Aire: Adopción de un modelo de dispersión preferido de propósito general (terreno plano y complejo) y otras revisiones. Registro Federal, Parte III, 40 CFR Parte 51 Norma definitiva.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2019). AERMOD Implementation Guide. <https://www.epa.gov/scram/air-quality-dispersion-modeling-preferred-and-recommended-models#aermod>
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2019). User's Guide for the AERMOD Meteorological Preprocessor (AERMET). Publication No. EPA-454/B-19-028, Office of Air Quality Planning and Standards - Air Quality Assessment Division. Research Triangle Park, NC.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2024). Technical Assistance Document for the Reporting of Daily Air Quality – the Air Quality Index (AQI). <https://document.airnow.gov/technical-assistance-document-for-the-reporting-of-daily-air-quality.pdf>
- UNS - Universidad Nacional del Sur. (Accesada en julio de 2025). La UNS – Reseña Histórica. https://uns.edu.ar/institucional/laUns_resena_historica
- Wang, P., Chen, K., Zhu, S., Wang, P., Zhang, H. (2020). Severe air pollution events not avoided by reduced anthropogenic activities during COVID-19 outbreak. Conservation and Recycling 158, 104814. doi:10.1016/j.resconrec.2020.104814
- Wang, P., Guo, H., Hu, J., Kota, S., Ying, Q., Zhang, H. (2019). Responses of PM2.5 and O₃ concentrations to changes of meteorology and emissions in China. Science of the Total Environment 662, 297–306. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.227

35.- Medio Ambiente y contaminación ambiental

Caracterización de detergentes biodegradables a base de coenzimas obtenidas de la fermentación de residuos agroindustriales

Autor: Montaña, Ivía; iviasandy@gmail.com

Orientador/a: Ortuño, Noel; n.ortuno@umss.edu.bo

Universidad Mayor de San Simón / Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales.

Laboratorio de Agromicrobiología y Bioinsumos.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue caracterizar detergentes biodegradables formulados con coenzimas obtenidas a partir de la fermentación de residuos agroindustriales, (cáscaras de piña y naranja) durante 90 días, empleando azúcar y chancaca como fuentes de carbohidrato. Fueron evaluados los parámetros fisicoquímicos, la actividad enzimática, la actividad antimicrobiana y la cuantificación microbiana de las coenzimas. La coenzima elaborada con cáscara de piña y chancaca presentó mayor contenido de ácido acético, mejor actividad enzimática y capacidad antimicrobiana, por lo que fue seleccionada para formular tres detergentes: dos líquidos con diferente pH, y uno en gel. Se realizaron pruebas comparativas con dos detergentes comerciales, uno líquido y otro en gel. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas (pH y densidad), la actividad enzimática (amilasa, lipasa, proteasa y celulasa), el efecto antimicrobiano frente a cuatro cepas patógenas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603), la cuantificación microbiana y la toxicidad en *Artemia salina*, *Bacillus amylolyquefaciens*, *Trichoderma* sp. y semillas de alfalfa (*Medicago sativa*). El formulado 2, cuyo pH era 6, presentó mayor estabilidad enzimática y mejor efecto antimicrobiano, en general. Ningún producto resultó tóxico para el microcrustáceo, los microorganismos y las semillas. Se observó un posible efecto de los detergentes formulados en la promoción del crecimiento de las raíces durante la germinación.

Palabras clave: detergente biodegradable, coenzima, residuos agroindustriales

Introducción

La gestión ineficiente de residuos orgánicos es un problema ambiental y sanitario a nivel mundial. Debido al incremento poblacional,

hay un aumento constante en la generación de desechos, y la tecnología y políticas de gestión de residuos existentes no han podido seguir el ritmo del aumento en la producción

de estos (Saramanda y Kaparapu, 2017; Muliarta y Darmawan, 2021).

Las industrias procesadoras de alimentos han experimentado un rápido crecimiento en las últimas décadas y generan grandes cantidades de residuos sólidos, como cáscaras y restos de frutas, que son una fuente rica en compuestos bioactivos con un valor potencial (Sagar, Pareek, Sharma, Yahia y Lobo, 2018; Arun y Sivashanmugan, 2015).

La fermentación de estos residuos orgánicos permite obtener ecoenzimas, que son bioproductos con propiedades funcionales con múltiples usos (Patel, Solanki y Mankad, 2021; Vama y Cherekar, 2020). Se ha utilizado exitosamente las ecoenzimas en productos de limpieza por su baja toxicidad, no es corrosivo, su buena capacidad de degradación y el respeto al medio ambiente (Istanti y Utami, 2022). Además, su producción a partir de residuos orgánicos reduce costos y ha demostrado, en ensayos comparativos, mayor eficacia antimicrobiana que algunos desinfectantes comerciales (Benny, Shams, Dash, Pandey y Bashir, 2023).

En Bolivia, anualmente se genera 1.7 millones de toneladas de residuos, de los cuales el 52.2 % son orgánicos. Lamentablemente, existen limitadas opciones de aprovechamiento eficiente, lo que agrava los problemas ambientales y de salud pública (Melgar, 2022).

La presente investigación propone

caracterizar detergentes biodegradables formulados con ecoenzimas obtenidas de la fermentación de residuos agroindustriales (cáscaras de naranja y piña), contribuyendo a la generación de alternativas innovadoras que promuevan la economía circular y los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en particular en salud, saneamiento, producción sostenible e innovación industrial (ODS 3, 6, 9, 12 y 13). Así, se pretende reducir el impacto ambiental de los residuos agroindustriales y generar productos de limpieza más seguros y sostenibles para la sociedad.

Objetivos

Evaluar los parámetros de calidad de las ecoenzimas obtenidas a partir de la fermentación de cáscaras de naranja y piña, utilizando azúcar y chancaca como fuentes principales de carbohidratos.

Evaluar los parámetros de calidad de los detergentes biodegradables, formulados con la ecoenzima seleccionada por su desempeño superior, en comparación con detergentes comerciales.

Materiales y Métodos

La investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Agrícola y Bioinsumos de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y Forestales y en el Centro de Tecnología Agroindustrial de la Facultad de Ciencias y Tecnología, ambos, pertenecientes a la Universidad Mayor de

San Simón.

Producción de ecoenzimas

Se prepararon ecoenzimas a partir de cáscara de naranja y piña, utilizando azúcar blanca y chancaca como fuente de carbohidrato. Los residuos orgánicos picados se mezclaron con la fuente de carbohidrato y agua, en proporción 3:1:10, respectivamente (Rahayu, Muliarta y Situmeang, 2021). La mezcla fue fermentada en envases de plástico durante 90 días, en un lugar fresco, seco, ventilado y libre de luz solar directa, removiendo ocasionalmente (Ramadani, Karima, y Ningrum, 2022; Saramanda y Kaparapu, 2017). Transcurrido ese tiempo, las ecoenzimas fueron filtradas (Gu et al., 2021).

Evaluación de los parámetros físicoquímicos

Se determinaron pH y sólidos disueltos totales (TDS) con el medidor portátil HANNA HI 9811-5. Los sólidos solubles totales (SST) se evaluaron mediante refractometría, con el medidor portátil Milwaukee MA871. La acidez total se cuantificó por titulación ácido-base.

Fueron evaluadas al inicio y a los 3, 6, 9, 12, 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 150 días, solo la acidez fue evaluada a partir del día 15.

Evaluación de la actividad enzimática

Fue evaluada a los 60, 75, 90 y 150 días de fermentación. Se realizó por el método de difusión en placa (Neupane y Khadka, 2019), modificado. La actividad proteasa

en el medio con agar bacteriológico (15 g/L) y leche desnatada en polvo al 1 %. Actividad amilasa en el medio Triptona Soya Agar (TSA) (20 g/L), agar bacteriológico (7.5 g/L) y almidón p.a. 1 %, después de la incubación se inundó con yodo para revelar la hidrólisis. Actividad lipasa en el medio de cultivo compuesto por agar bacteriológico (15 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/L) y NaCl (2.5 g/L), una vez esterilizado y enfriado hasta 43 °C, se añadió 10 % (v/v) del sobrenadante de yema de huevo estéril, previamente centrifugada a 2580 rpm durante 10 minutos (Fu et al., 1997) y 0.37 % (v/v) de Tween 80, previamente esterilizado por microfiltración. Actividad celulasa en medio con agar bacteriológico (15 g/L) y carboximetilcelulosa al 1%, después de la incubación se realizó la tinción con rojo Congo, conforme a lo indicado por Teather y Wood (1982). Se utilizó como testigo negativo agua destilada estéril y como testigo positivo el detergente mutienzimático Bonzyme (Eufar). Se perforó pocillos equidistantes de 5 mm de diámetro y se dosificó 30 µL de cada ecoenzima, previamente centrifugadas a 14800 rpm por 15 minutos. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C, después se midió el halo de degradación en milímetros para cuantificar la actividad.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de difusión en pozos de agar Mueller-Hinton, según lo descrito

por Ginting, Hasnudi, y Prayitno (2022) y Neupane y Khadka (2019), con algunas modificaciones. Fue evaluada a los 90 y a los 150 días. Las bacterias patógenas utilizadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, proporcionadas por Laboratorios de Investigación Médica (Labimed), perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón. Se preparó una suspensión de cada bacteria en agua destilada estéril, hasta obtener una turbiedad de 0.5 en la escala de McFarland. Se aplicaron 100 μ L de cuatro concentraciones de coenzimas diluidas en agua destilada estéril (25, 50, 75 y 100 %) en pozos de 7 mm de diámetro. Se utilizó agua destilada estéril como control negativo y disco de Ciprofloxacina 5 μ g (Oxoid), como control positivo. Se incubó a 37 °C durante 18 horas y finalmente se midió con un calibrador digital, el diámetro (mm) de la zona de inhibición.

Cuantificación microbiana

El recuento de bacterias y hongos viables se realizó por siembra en placa, en Triptona Soya Agar (TSA) y Papa Dextrosa Agar (PDA), respectivamente. Después de 24-48 horas de incubación (bacterias a 37 °C y hongos a 29°C), se contaron las colonias y los resultados se expresaron en UFC/mL.

Formulación de los detergentes

Se seleccionó la coenzima obtenida de

cáscara de piña con chancaca, porque presentó mayor porcentaje de ácido acético, mejor actividad enzimática y efecto antimicrobiano.

Con esta base, se desarrollaron tres formulaciones de detergentes: dos líquidas, con diferencias en el pH, y una en gel.

Las formulaciones contenían tensioactivos anfóteros de origen vegetal (15–20 %), coenzima (50 %), sorbato de potasio 0.2 %, aceite esencial 0.082 %, colorante grado alimenticio c.s.p., agua destilada y aditivos como sal gruesa 1 % y espesante de base biológica 2.5 %, en el caso del gel. El pH fue ajustado con NaOH al 10 %.

Tras la preparación, los detergentes se evaluaron inicialmente y luego de 90 días, para comparar su estabilidad frente a dos productos comerciales: uno líquido y otro en gel.

Evaluación de los parámetros físicoquímicos

Se midió el pH y la densidad fue determinada por el método del picnómetro.

Evaluación de la actividad enzimática

Se evaluaron las actividades proteasa, amilasa, lipasa y celulasa, del mismo modo que para las coenzimas con la única diferencia que se perforaron pocillos de 7 mm de diámetro a los que se aplicaron 50 μ L de cada detergente.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se procedió del mismo modo que para las coenzimas.

Cuantificación microbiana

Para la cuantificación bacteriana y fúngica se siguió el método ya descrito, fueron sembrados los detergentes puros, sin previa dilución.

Prueba de toxicidad aguda con *Artemia salina*

Se utilizó la metodología de Franco y Velasco (2024). Se preparó una solución salina artificial (35 g/L) donde se incubaron huevos de *Artemia salina* con aireación y luz, hasta su eclosión. Posteriormente, se distribuyeron 10 nauplios por pozo, en microplacas Falcon de 24 pozos, fueron evaluadas cinco concentraciones de cada detergente (10, 20, 50, 70 y 100 mg/L), más un control negativo. Luego de 24 horas, se registró la mortalidad larval y se calculó la dosis letal media (DL_{50}) utilizando el software SAS-Probit. La clasificación toxicológica se basó en la DL_{50} , considerando como “muy tóxicos” los valores menores a 10 mg/L, “tóxicos” entre 10–50 mg/L y “no tóxicos” mayores a 50 mg/L.

Prueba de toxicidad con microorganismos

Se evaluó el efecto de los detergentes sobre *Bacillus amyloliquefaciens* y *Trichoderma* sp. cepa TCO13, pertenecientes al banco de cepas del laboratorio de Microbiología Agrícola y Bioinsumos. Se evaluaron ocho concentraciones (10, 20, 50, 70, 100, 200, 300 y 500 mg/L) de cada detergente, se utilizó agua destilada estéril como testigo negativo. Se perforaron 17 pozos equidistantes de 7 mm de diámetro y se

dosificó a cada uno 100 μ L de cada concentración de detergente. Se incubaron a 37 °C durante 18 horas y se observó la formación de halos de inhibición alrededor de los pozos.

Para el hongo, se siguió el método de Cazares et al. (2023). Se activó *Trichoderma* sp. en medio PDA durante cinco días. El inóculo se ajustó a 1×10^6 conidios/mL. Luego, se sembraron 100 μ L en placas PDA y se perforaron 17 pozos para aplicar las mismas concentraciones de los detergentes usados en bacterias. Las placas se incubaron a 29 °C durante 72 horas y se registraron los halos de inhibición.

Prueba de fitotoxicidad en semillas

La prueba se realizó según Rocha e Silva, Almeida, Rocha e Silva, Luna, y Sarubbo (2020), con algunas modificaciones. Se usaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) enjuagadas y remojadas en agua durante 15 horas. Fueron evaluadas cinco concentraciones de los detergentes (10, 20, 50, 70 y 100 mg/L). Se colocaron 10 semillas por placa Petri con papel filtro humedecido con 5 mL de cada dilución. Luego de tres días en oscuridad, se evaluó la germinación, el crecimiento radicular (≥ 5 mm) y el índice de germinación (IG). Solo los detergentes con IG > 80 % fueron considerados no tóxicos.

Se utilizó el diseño completamente al azar (DCA), con tres repeticiones. El análisis de datos fue realizado con el paquete estadístico Statistical Analysis System

(SAS), con un grado de confianza del 95 %. La comparación de medias entre tratamientos se efectuó mediante la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

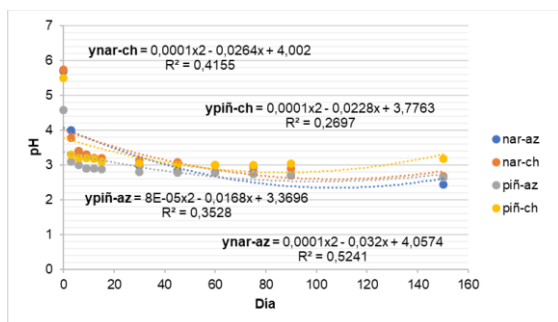
Resultados y Discusión

Producción de coenzimas

Evaluación de los parámetros físicoquímicos

El análisis de varianza (ANOVA) para las variables de respuesta: pH, sólidos disueltos totales, sólidos solubles totales y acidez total, mostró diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre los tratamientos, los días de evaluación y la interacción entre ambos factores, lo que indica un efecto combinado.

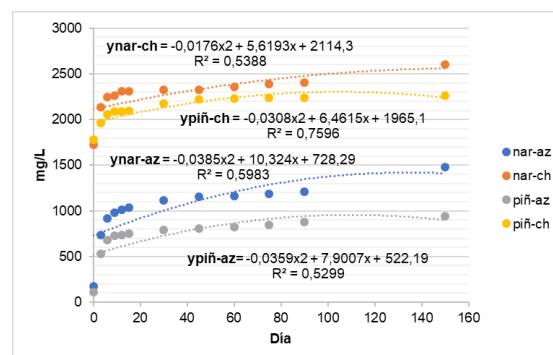
Figura 1. Variación del pH en las ecoenzimas, durante el proceso de fermentación



La Figura 1 muestra un descenso del pH en todos los tratamientos. El pH inicial estaba entre 4.6 y 5.7 y hasta el tercer día descendió hasta aproximadamente 4 para las ecoenzimas con cáscara de naranja y 3 para las de cáscara de piña, en todos los casos el pH fue disminuyendo lentamente hasta el día 150, solo en la ecoenzima de cáscara de piña-chancaca se observa un

leve incremento al último día de muestreo. Rasit, Hwe Fern, y Ab Karim Ghani (2019) y Natasya et al. (2023) reportaron pH similares en ecoenzimas de naranja y piña, respectivamente. Según Rasit et al. (2019), un pH menor a 4 indica buena calidad del bioproducto, porque evidencia un mayor contenido de ácidos orgánicos. Las variaciones entre residuos y fuentes de carbono explican las diferencias entre formulaciones.

Figura 2. Variación de los sólidos disueltos totales en las ecoenzimas, durante el proceso de fermentación



La Figura 2 muestra que las ecoenzimas elaboradas con chancaca presentaron valores de sólidos disueltos totales (SDT) mucho más altos que aquellas con azúcar refinada. Esto puede atribuirse al mayor contenido de minerales y compuestos complejos de la chancaca. Al respecto, Wulandari y Winarsih (2024), señalan que el valor elevado de los SDT en las ecoenzimas se relaciona con el contenido de materia orgánica y azúcares utilizados como sustrato durante la fermentación.

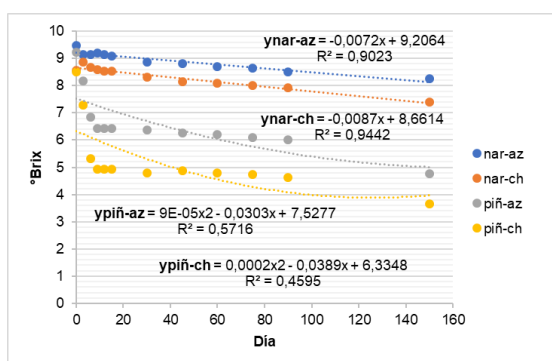
En todos los tratamientos el valor de la variable incrementa en el tiempo.

Respecto al tipo de residuo, las ecoenzimas con cáscara de piña reportan un valor menor comparado a las de cáscara de naranja.

Estudios previos reportaron valores variables de SDT en ecoenzimas de cáscara de naranja, que oscilan entre 1300 mg/L (Patel et al., 2021), 1560 mg/L (Muktiarni, Rahayu y Maryanti, 2022) y hasta 14000 mg/L (Rasit, et al., 2019). Asimismo, Permatananda, Pandit, Cahyawati y Aryastuti (2023) observaron una disminución progresiva de los SDT durante la fermentación.

Las diferencias pueden deberse a características intrínsecas del residuo, la fuente de carbohidrato, condiciones ambientales, entre otros.

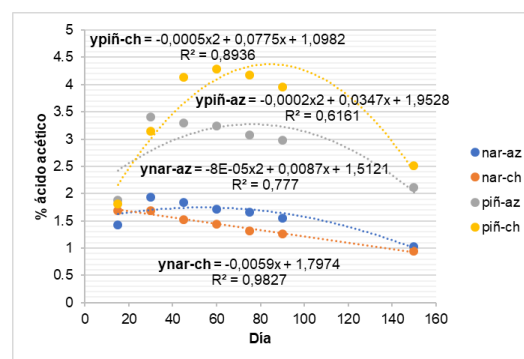
Figura 3. Variación de los sólidos solubles totales en las ecoenzimas, durante el proceso de fermentación.



La Figura 3 muestra una disminución gradual de los sólidos solubles en el tiempo, como reflejo del consumo de azúcares durante la fermentación. Las ecoenzimas de cáscara de piña registraron valores más bajos que las de naranja. En cuanto a la fuente de carbohidrato, las formulaciones con chancaca presentaron valores menores de °Brix que aquellas con azúcar blanca, lo que

podría atribuirse a su menor contenido de sacarosa pura y proporción significativa de compuestos no azucarados como minerales y melanoidinas.

Figura 4. Variación de la acidez total en las ecoenzimas, durante el proceso de fermentación.



La Figura 4 muestra que las ecoenzimas con cáscara de piña presentaron la mayor acidez total, alcanzando 4.28 % de ácido acético a los 60 días (chancaca) y 3.41 a los 30 días (azúcar). Este comportamiento sugiere que la cáscara de piña, favorece a una mayor producción de ácido acético.

Estudios previos presentaron valores variables. Samriti y Arya (2019) obtuvieron 4.2 % para ecoenzimas de una mezcla de cáscaras de fruta con melaza a los 90 días, mientras que Farma et al. (2024) reportaron valores de 4.53 % y 4.27 % en ecoenzimas con cáscara de naranja de diferentes variedades a los 100 días.

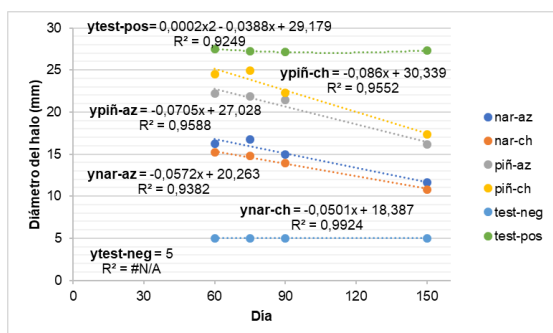
En todos los tratamientos una vez alcanzado el nivel máximo la concentración de ácido acético disminuyó gradualmente hasta el final de la fermentación. Según Natasya et al. (2023), este comportamiento responde a la dinámica natural del proceso:

en el primer mes predomina la producción de alcohol, en el segundo la de ácido acético y en el tercero la de enzimas.

Evaluación de la actividad enzimática

Las actividades enzimáticas amilasa y lipasa fueron significativas entre tratamientos según el ANOVA, pero no se observaron diferencias entre las ecoenzimas, solo el testigo positivo presentó un valor estadísticamente superior a las demás ($p < 0.05$). Esto podría deberse al pH ácido de las ecoenzimas desde los primeros días de fermentación, lo cual, según Rasit et al. (2019), no favorece la expresión de estas enzimas, que prefieren pH cercanos a la neutralidad. Además, en el caso de la lipasa, el medio para la evaluación pudo no ser el más adecuado. El análisis de varianza (ANOVA) para las actividades proteasa y celulasa muestra diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre los tratamientos, los días de evaluación y la interacción entre ambos factores, lo que indica un efecto combinado en estas variables de respuesta.

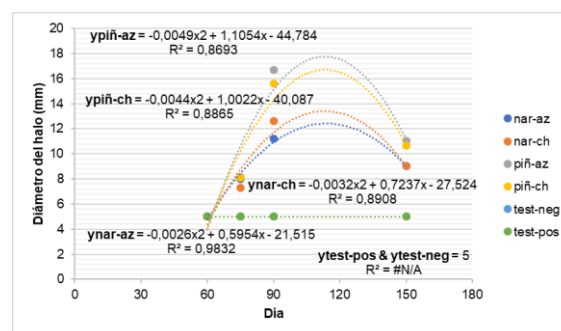
Figura 5. Variación de la actividad proteasa en las ecoenzimas, durante la fermentación.



En la Figura 5 se observa que la ecoenzima

de cáscara de piña-chancaca reportó el mayor halo de hidrólisis de proteína (24.93 mm a los 75 días), siendo estadísticamente superior ($p < 0.05$) a las demás formulaciones.

Figura 6. Variación de la actividad celulasa en las ecoenzimas, durante la fermentación.



La Figura 6 muestra que los testigos positivo y negativo no reportaron actividad celulasa. Todas las ecoenzimas presentaron su mayor actividad a los 90 días. Las que fueron formuladas con cáscaras de piña obtuvieron los halos de hidrólisis más altos, 16.71 mm (azúcar) y 15.61 mm (chancaca), ambas estadísticamente iguales ($p < 0.05$).

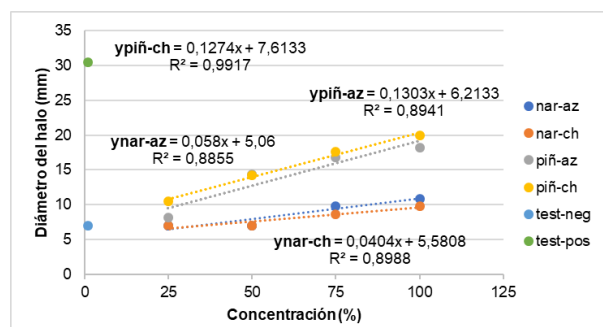
Estos resultados difieren con lo reportado por Neupane y Khadka (2019), que obtuvieron halos de 28 mm para amilasa, 12 mm para proteasa y ausencia de actividad lipasa y celulasa, en ecoenzima de cáscara de piña. Samriti y Arya (2019), Hanifah et al. (2022) y Gaspersz y Fitrihidajati (2022) indican que la actividad enzimática de las ecoenzimas está influenciada por la composición del residuo orgánico, el tipo de carbohidrato utilizado, la duración de la fermentación y la actividad de

los microorganismos naturalmente presentes en estos ingredientes.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

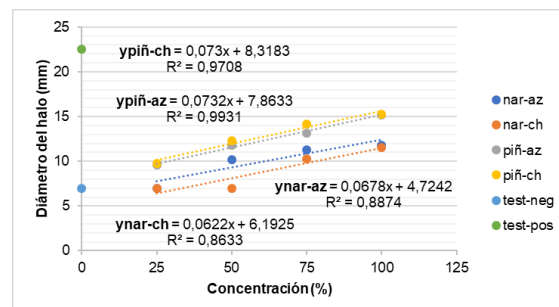
El análisis de varianza (ANOVA) para la actividad antimicrobiana contra las 4 cepas patógenas evaluadas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, mostró diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre los tratamientos, las concentraciones y la interacción entre ambos factores.

Figura 7. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de las ecoenzimas contra *E. coli* ATCC 25922



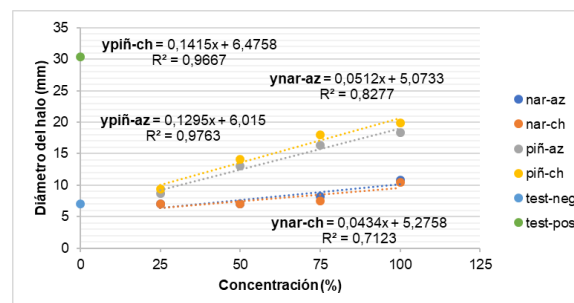
En la Figura 7 se observa que, entre las ecoenzimas, las elaboradas con cáscara de piña presentaron el mayor diámetro del halo de inhibición frente a *E. coli*, siendo la formulación con chancaca significativamente superior ($p < 0.05$) a la obtenida con azúcar. En cambio, las formulaciones a base de cáscara de naranja no difirieron significativamente ($p < 0.05$) del testigo negativo. Además, las ecoenzimas sin diluir evidenciaron un mejor control del crecimiento bacteriano.

Figura 8. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de las ecoenzimas contra *S. aureus* ATCC 25923



En la Figura 8 se observa que los tratamientos con cáscara de piña evidenciaron un control frente a *S. aureus*, significativamente superior ($p < 0.05$) a las ecoenzimas de cáscara de naranja, que, a su vez, fueron mejores que el testigo negativo ($p < 0.05$). El testigo positivo presentó un diámetro de halo de inhibición estadísticamente superior a todos los tratamientos ($p < 0.05$).

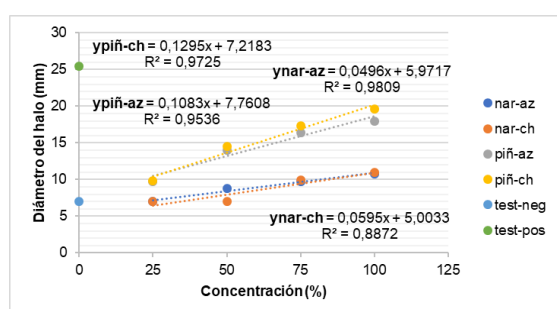
Figura 9. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de las ecoenzimas contra *P. aeruginosa* ATCC 27853



En la Figura 9 se observa que, aunque las ecoenzimas con cáscara de piña no alcanzaron la eficacia del testigo positivo, lograron un mayor control del crecimiento de *P. aeruginosa*, en comparación con las formuladas con cáscara de naranja, cuyas

respuestas fueron estadísticamente iguales al testigo negativo ($p < 0.05$). La combinación cáscara de piña-chancaca, reportó el valor más alto, con diferencias significativas frente a las demás formulaciones ($p < 0.05$).

Figura 10. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de las ecoenzimas contra *K. pneumoniae* ATCC 700603



En la Figura 10 se observa que las ecoenzimas elaboradas con cáscara de piña evidenciaron una mayor inhibición contra *K. pneumoniae*, siendo ambas estadísticamente superiores ($p < 0.05$) a las formuladas con cáscara de naranja.

La actividad antibacteriana observada en las ecoenzimas formuladas con cáscara de piña se aproxima a lo reportado por Neupane y Khadka (2019), quienes obtuvieron halos de inhibición de entre 24 y 27 mm frente a cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, utilizando la misma materia prima.

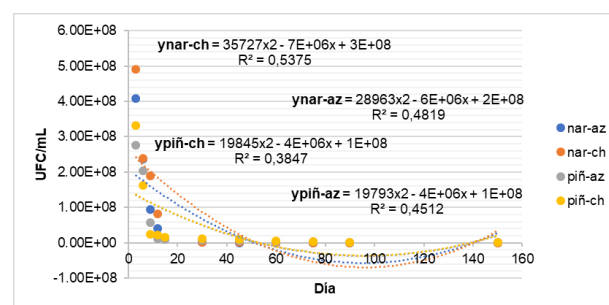
La cáscara de piña es una de las materias primas más utilizadas por su capacidad para inhibir microorganismos Gram positivos, Gram negativos y algunos hongos, con un efecto considerado de

moderado a fuerte (Sunarsih, Mustikaningtyas y Widiatningrum, 2024). Como señalan Welfalini, Suartha y Sudipa (2022), a mayor concentración del antimicrobiano, mayor es la eficacia inhibitoria y, por tanto, el tamaño del halo, lo que explica las diferencias observadas.

Cuantificación microbiana

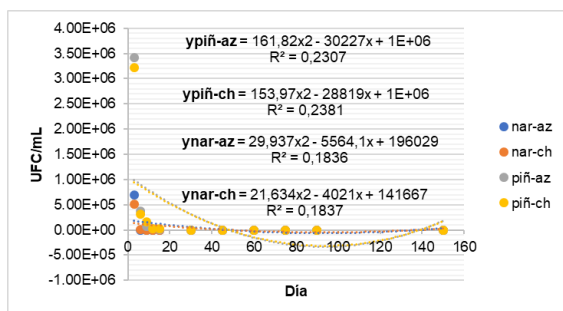
El análisis estadístico basado en la prueba de χ^2 (chi-cuadrado) evidenció diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre tratamientos, los días de fermentación y su interacción, para las variables de respuesta bacterias y hongos totales.

Figura 11. Variación de las bacterias totales en las ecoenzimas, durante la fermentación.



La Figura 11 muestra que al tercer día la población bacteriana en todas las ecoenzimas se encontraba en el orden de 10^8 UFC/mL, durante el transcurso de la fermentación disminuyó progresivamente y al finalizar, las ecoenzimas de cáscara de piña presentaron las concentraciones más altas, 10^6 UFC/mL (con chancaca) y 10^5 UFC/mL (con azúcar). En cambio, las ecoenzimas con cáscara de naranja alcanzaron una concentración de 10^4 UFC/mL, a los 150 días.

Figura 12. Variación de los hongos totales en las ecoenzimas, durante la fermentación



Los resultados mostraron un crecimiento exclusivo de levaduras. En la Figura 12 se observa que las ecoenzimas elaboradas con cáscara de piña presentaron los mayores conteos iniciales, del orden 10^6 UFC/mL, que disminuyeron progresivamente hasta alcanzar 10^3 UFC/mL (con azúcar) y 10^4 UFC/mL (con chancaca) al día 15, para el día 30 de fermentación ya no se detectaron colonias de levaduras.

En contraste, las ecoenzimas de cáscara de naranja mostraron conteos iniciales de 10^5 UFC/mL, pero experimentaron una disminución abrupta al sexto día alcanzando valores de 10^1 UFC/mL (azúcar) y 10^2 UFC/mL (chancaca), posiblemente debido a la liberación de aceites esenciales y otros compuestos antimicrobianos presentes en la cáscara, que inhiben el desarrollo microbiano y afectan la actividad enzimática y antibacteriana. Al respecto, Gaspersz y Fitrihidajati (2022) mencionan que la supervivencia de los microorganismos depende de las condiciones que se generan durante la fermentación.

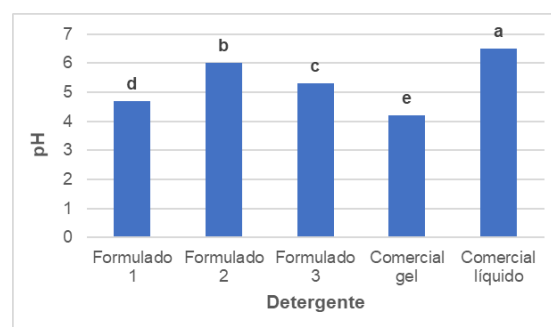
Formulación de los detergentes

Aunque algunos autores han trabajado en la formulación de detergentes con ecoenzimas, no se encontraron reportes científicos que evalúen de manera integral las propiedades fisicoquímicas, la actividad enzimática, el efecto antimicrobiano y la toxicidad de este tipo de formulaciones. Esto evidencia una brecha en la literatura que justifica la presente investigación.

Evaluación de los parámetros fisicoquímicos

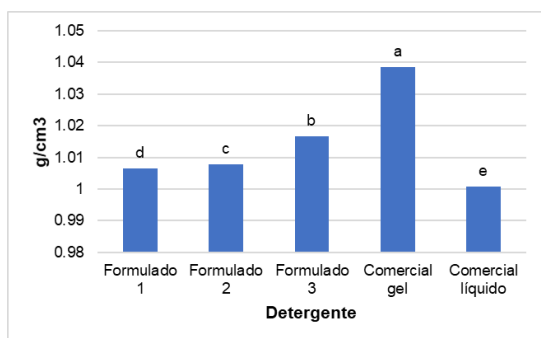
El análisis de varianza (ANOVA) para las variables pH y densidad, muestra diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre los detergentes.

Figura 13. pH de los detergentes



La Figura 13 muestra los valores del pH de las tres formulaciones elaboradoras y los detergentes comerciales.

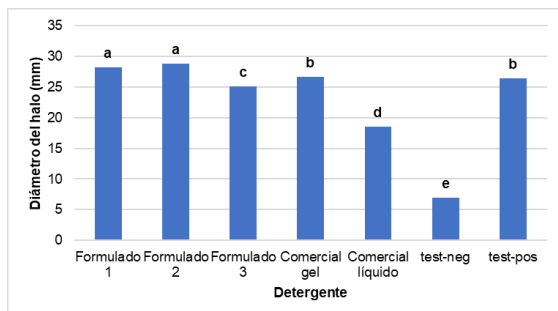
Se formularon tres detergentes: dos en presentación líquida y uno en gel. El formulado 1 tenía un pH de 4.7, en el segundo se ajustó el pH a 6, mientras que en el formulado 3 (gel) se elevó hasta 5.3. Como referencia, el pH de los detergentes comerciales fueron 4.2 (gel) y 6.5 (líquido). En todos los casos, los valores de pH se mantuvieron estables durante el almacenamiento.

Figura 14. Densidad de los detergentes

La Figura 14 muestra la densidad de los detergentes formulados y de los dos testigos comerciales. El detergente con mayor densidad fue el comercial en gel (1.0387 g/cm³), seguido del formulado 3 (gel), con 1.0168 g/cm³. Los formulados 1, 2 (líquidos) y comercial líquido presentaron densidades de 1.0065, 1.0078 y 1.008 g/cm³, respectivamente. Las densidades se mantuvieron constantes durante el período de almacenamiento.

Evaluación de la actividad enzimática

El análisis de varianza (ANOVA) para las actividades amilasa, proteasa, lipasa y celulasa muestra diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre los detergentes. Solo en el caso de la amilasa y celulasa, se registra diferencias significativas entre los días y la interacción de ambos factores.

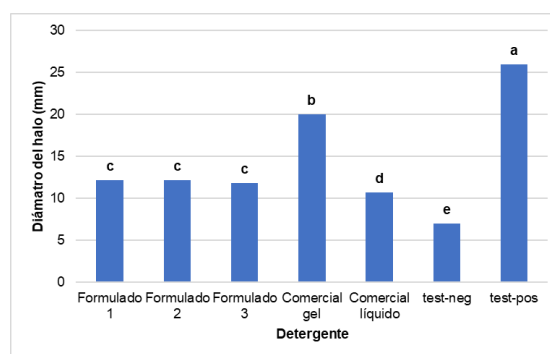
Figura 15. Actividad amilasa de los detergentes

La Figura 15 muestra que los formulados 1

y 2 (líquidos) presentaron los mayores diámetros de halo de hidrólisis de almidón, siendo estadísticamente superiores ($Pr < 0.05$) al testigo positivo y a los detergentes comerciales.

La actividad amilasa no se detectó en las ecoenzimas, pero sí en los detergentes formulados. Esta diferencia podría atribuirse al pH más ácido de las ecoenzimas, que pudo inhibir la expresión de la enzima, en contraste con el pH de los detergentes, que fueron más altos. Además, los otros componentes podrían favorecer en la estabilidad o expresión de la amilasa.

En cuanto al tiempo, en el muestreo de los 90 días se registró un leve incremento en los diámetros del halo de hidrólisis de los detergentes formulados, respecto a los valores iniciales.

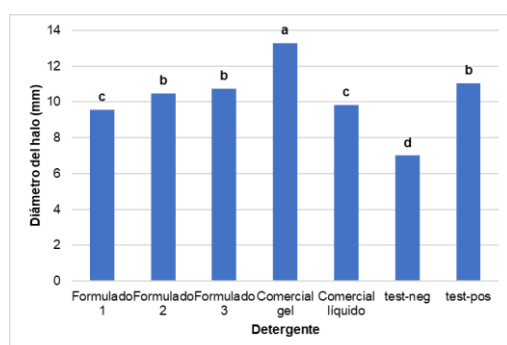
Figura 16. Actividad proteasa de los detergentes

La Figura 16 muestra que el detergente comercial en gel presentó el mayor diámetro de halo de hidrólisis de proteína entre los detergentes evaluados, siendo estadísticamente superior a los formulados ($Pr < 0.05$).

La ecoenzima mostró una mayor actividad

proteasa, con valores cercanos al testigo positivo, lo cual no se replicó en los detergentes formulados. Esta disminución podría atribuirse al efecto de los demás componentes presentes en las formulaciones, como tensioactivos o conservantes, que posiblemente interfirieron con la estabilidad o funcionalidad de las enzimas.

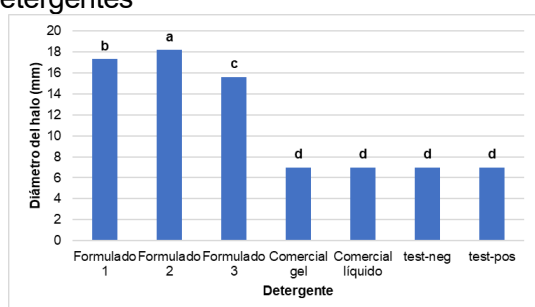
Figura 17. Actividad lipasa de los detergentes



La Figura 17 muestra que el detergente comercial en gel presentó un valor estadísticamente superior ($Pr < 0.05$) al testigo positivo y a los demás detergentes evaluados.

La escasa expresión de actividad lipasa tanto en las ecoenzimas como en los detergentes, e incluso en el testigo positivo, sugiere que el medio de cultivo utilizado no fue el más adecuado para detectar esta enzima.

Figura 18. Actividad celulasa de los detergentes



La Figura 18 muestra que el formulado 2 presentó el mayor diámetro de halo de hidrólisis de celulosa, siendo estadísticamente superior a los demás formulados ($Pr < 0.05$). En contraste, los detergentes comerciales y el testigo positivo no mostraron actividad celulasa.

Si bien la ecoenzima de cáscara de piña con chancaca mostró actividad celulasa, se obtuvieron mejores resultados con los detergentes formulados. Esta diferencia podría deberse al pH más ácido de las ecoenzimas, que puede afectar negativamente la expresión y detección de la enzima.

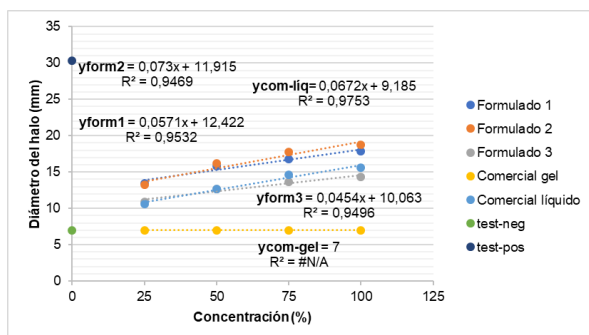
Respecto al tiempo, en la evaluación de los 90 días, los detergentes formulados registraron un incremento en la actividad celulasa en comparación a los valores iniciales.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

El análisis de varianza (ANOVA) para la actividad antimicrobiana contra las cuatro cepas patógenas evaluadas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, mostró diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre los detergentes, las concentraciones y la interacción entre ambos factores, lo que indica un efecto combinado. Para *E. coli* y *S. aureus*, se observan también diferencias significativas entre los días de evaluación y la interacción de detergente*concentración*día, lo que indica

que en estos dos casos hubo diferencias en los valores obtenidos entre el muestreo inicial y a los 90 días.

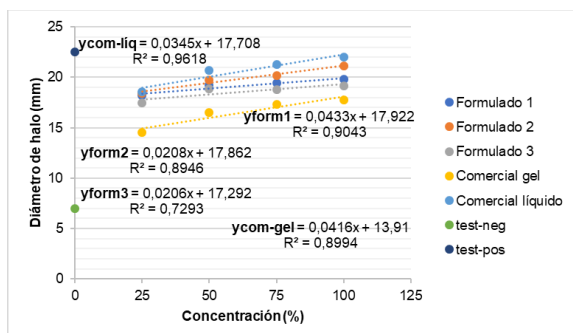
Figura 19. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de los detergentes contra *E. coli* ATCC 25922



La Figura 19 muestra que el formulado 2 presentó el mayor efecto inhibitorio sobre *E. coli*, siendo estadísticamente superior a los demás detergentes ($Pr < 0.05$), le siguieron el formulado 1, el detergente comercial líquido y el formulado 3 (gel). En cambio, el detergente comercial en gel no mostró actividad antimicrobiana ($Pr < 0.05$).

Respecto al tiempo, hubo una leve variación en los valores registrados entre el muestreo inicial y a los 90 días, siendo un incremento en la mayoría de los casos.

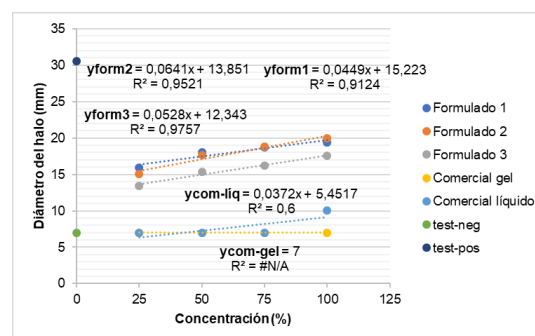
Figura 20. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de los detergentes contra *S. aureus* ATCC 25923



La Figura 20 muestra que el detergente comercial líquido presentó la mayor inhibición sobre *S. aureus*, siendo estadísticamente superior a los demás detergentes, pero inferior al testigo positivo ($Pr < 0.05$).

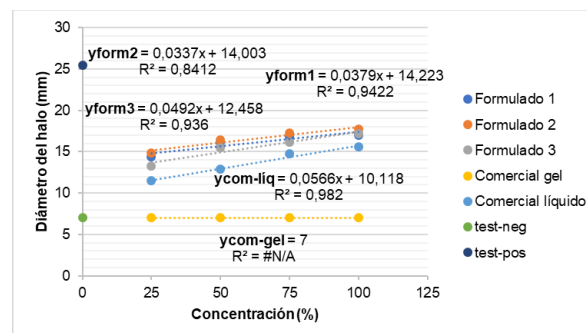
A los 90 días, los detergentes evidenciaron valores menores en comparación a los obtenidos al inicio, para esta variable.

Figura 21. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de los detergentes contra *P. aeruginosa* ATCC 27853



La Figura 21 muestra que los formulados 1 y 2 (líquidos) presentaron la mayor inhibición contra *P. aeruginosa*, siendo ambos estadísticamente superiores al formulado 3 (gel) y al detergente comercial líquido, pero inferiores al testigo positivo ($Pr < 0.05$).

Figura 22. Actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de los detergentes contra *K. pneumoniae* ATCC 700603



La Figura 22 muestra que el formulado 2 presentó la mayor inhibición contra *K. pneumoniae*, siendo estadísticamente superior al formulado 1 ($Pr < 0.05$), que, a su vez, es mejor que el formulado 3 y el detergente comercial líquido. En contraste, el detergente comercial en gel no evidencia halos de hidrólisis de inhibición, siendo significativamente igual al testigo negativo ($Pr < 0.05$).

En todos los casos donde hubo efecto antimicrobiano, la mayor inhibición se observó con el detergente puro sin diluir.

Cuantificación microbiana

No se observó crecimiento de bacterias y hongos en ninguno de los detergentes, tanto comerciales como formulados, ni al inicio ni después del período de almacenamiento.

Prueba de toxicidad aguda con *Artemia salina*

El análisis de varianza (ANOVA) para la toxicidad aguda con *Artemia salina* mostró

diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre los detergentes y las concentraciones evaluadas, así como una interacción significativa entre ambos factores ($Pr = 0.0035$).

Tabla 1. Toxicidad aguda de los detergentes en *Artemia salina*

Detergente	Mortalidad (%) por concentración					DL50 (mg/L)	Clasificación toxicológica
	10 mg/L	20 mg/L	50 mg/L	70 mg/L	100 mg/L		
Formulado 1	15	25	30	30	35	475.12	no tóxico
Formulado 2	15	15	15	25	30	1856.37	no tóxico
Formulado 3	5	10	20	25	30	287.32	no tóxico
Comercial gel	15	30	35	50	75	56.73	no tóxico
Comercial líquido	15	25	25	25	35	962.24	no tóxico

La Tabla 1 muestra la dosis letal media (DL_{50}) y la clasificación toxicológica de los detergentes evaluados. Ninguno de los productos fue clasificado como tóxico; sin embargo, el detergente comercial en gel presentó mayor toxicidad que los formulados 3 y 1. Los menos tóxicos fueron el formulado 2 y el comercial líquido.

Al relacionar estos resultados con el pH, se observa que los productos más tóxicos tenían pH más ácido (comercial gel, formulados 1 y 3), mientras que los menos tóxicos presentaban pH más elevados (comercial líquido y formulado 2). Esto sugiere que la toxicidad observada en *Artemia salina*, podría deberse tanto a los componentes de los detergentes como a su acidez.

Prueba de toxicidad con microorganismos

No se observaron halos de inhibición del crecimiento en *Bacillus amyloliquefaciens* a las 18 horas, ni en *Trichoderma sp.* a las 72 horas, para ninguna de las ocho concentraciones evaluadas. Esto sugiere que, bajo las condiciones del ensayo, los detergentes no afectaron el crecimiento de los microorganismos utilizados.

Prueba de fitotoxicidad en semillas

El análisis de varianza (ANOVA) para la fitotoxicidad con semillas de alfalfa mostró diferencias significativas ($Pr < 0.0001$) entre los detergentes y las concentraciones evaluadas.

Tabla 2. Fitotoxicidad de los detergentes evaluados en semillas de *Medicago sativa*

Detergente	Índice de germinación (%)	Clasificación toxicológica
Formulado 1	111.73	no tóxico
Formulado 2	110.28	no tóxico
Formulado 3	109.33	no tóxico
Comercial gel	100.84	no tóxico
Comercial líquido	99.64	no tóxico

La Tabla 2 presenta el porcentaje del índice de germinación y la clasificación toxicológica de los detergentes evaluados. Ninguno de los productos se considera tóxico bajo las condiciones analizadas. Los tres detergentes formulados mostraron una longitud radicular superior a la del control, lo que sugiere un posible efecto bioestimulante sobre el crecimiento vegetal.

Según Benny et al. (2023), las ecoenzimas pueden emplearse como fertilizantes orgánicos líquidos que promueven un crecimiento acelerado de las plantas.

Conclusiones

Las ecoenzima de cáscara de piña con chancaca destacó por su mayor contenido de ácido acético, mejor actividad enzimática y capacidad antimicrobiana, por lo que fue seleccionada para la formulación.

Los detergentes formulados, especialmente el formulado 2 (líquido, pH 6), mostraron buena estabilidad, mayor actividad enzimática y mejor efecto antimicrobiano frente a cepas patógenas,

superando incluso a los productos comerciales en varios parámetros. No se detectó toxicidad en pruebas con *Artemia salina*, microorganismos del suelo ni semillas de alfalfa, lo que confirma su potencial como productos de limpieza biodegradables, seguros y eficaces.

Pese a que existen estudios previos sobre detergentes con ecoenzimas, no se hallaron reportes que evalúen integralmente sus propiedades fisicoquímicas, enzimáticas, antimicrobianas y toxicológicas, lo que resalta la pertinencia y el carácter innovador de esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Arun, C., y Sivashanmugam, P. (2015). Investigation of biocatalytic potential of garbage enzyme and its influence on stabilization of industrial waste activated sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, 94, 471–478. doi:10.1016/j.psep.2014.10.008
- Benny, N., Shams, R., Dash, K. K., Pandey, V. K., y Bashir, O. (2023). Recent trends in utilization of citrus fruits in production of eco-enzyme. *Journal of Agriculture and Food Research*, 13. doi:10.1016/j.jafr.2023.100657
- Cazares, A. G., Rodríguez, J., Sánchez, E., De Lara, J., García, K., Leos, C., y Castillo, S. (2023). Efecto del aceite esencial de orégano y sus

- fracciones concentradas en el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* (niger). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 132-139. doi:10.29105/idcyta.v8i1.21
- Farma, S. A., Islami, A., Putri, I. L. E., Handayani, D., Putri, D. H., y Anhar, A. (2024). Identification of acetic acid levels in ecoenzyme from organic materials of orange peel with acid-base titration method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 1312(1). doi: 10.1088/1755-1315/1312/1/012055
- Franco, C. y Velasco, I. (2024). *Aplicaciones biocida y cosmética del aceite esencial y extracto etanólico de jengibre (Zingiber officinale)* (proyecto de pregrado). Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.
- Fu, Y., Ibrahim, A. S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F., y Ghannoum, M. A. (1997). Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology*, 143(2), 331-340. doi:10.1099/00221287-143-2-331
- Gaspersz, M. M., y Fitrihidajati, H. (2022). Pemanfaatan ekoenzim berbahan limbah kulit jeruk dan kulit nanas sebagai agen remediasi LAS detergen. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 11(3), 503-513. doi:10.26740/lenterabio.v11n3.p503-513
- Ginting, N., Hasnudi, Y., y Prayitno, L. (2022). Dilution of Eco Enzyme and Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis (JITRO)*, 9(1), 123-128. doi:10.33772/jitro.v9i1.19705
- Gu, S., Xu, D., Zhou, F., Chen, C., Liu, C., Tian, M., y Jiang, A. (2021). The garbage enzyme with chinese hoenylocust fruits showed better properties and application than when using the garbage enzyme alone. *Foods*, 10(11). Doi:10.3390/foods10112656
- Hanifah, I. A., Primarista, N. P. V., Prasetyawan, S., Safitri, A., Adyati, T., y Srihadyastutie, A. (2022). The effect of variations in sugar types and fermentation time on enzyme activity and total titrated acid on eco-enzyme results of fermentation. In *7th International Conference on Biological Science (ICBS 2021)* (pp. 585-589). Atlantis Press. doi: 10.2991/absr.k.220406.084
- Istanti, A., y Utami, S. W. (2022). Utilization of Household Waste into Eco-Enzyme in Gitik Village, Rogojampi District, Banyuwangi. *Warta Pengabdian*, 16(1), 30-43.

- doi:10.19184/wrtp.v16i1.27328
- Melgar, S. M. (2022). El mercado de la gestión de residuos sólidos en Bolivia. Recuperado de https://www.icex.es/content/dam/es/icex/oficinas/062/documentos/2022/06/documentos-anexos/DOC2022910093_2.pdf
- Muktiarni, M., Rahayu, N. I., y Maryanti, R. I. N. A. (2022). Orange and strawberry skins for eco-enzyme: Experiment and bibliometric analysis. *Journal of Engineering Science and Technology*, 1, 195-206. Recuperado de https://jestec.taylors.edu.my/Special%20Issue%20ISCoE%202022_1/ISCoE%201_17.pdf
- Muliarta, I., y Darmawan, K. (2021). Processing Household Organic Waste into Eco-Enzyme as an Effort to Realize Zero Waste. *Agriwar Journal*, 1(1), 6–11. doi:10.22225/aj.1.1.3658.6-11
- Natasya, N., Fadilah, M., Fitri, R., Farma, S. A., Raharjeng, A. R. P., y Simwela, M. (2023). Analyzing the Quality of Eco-Enzymes Based on Differences in Plant Tissue on the Organic Matter. *Jurnal Biota Radenfatah*, 9(1), 45–53. doi:10.19109/biota.v9i1.13166
- Neupane, K., y Khadka, R. (2019). Production of Garbage Enzyme from Different Fruit and Vegetable Wastes and Evaluation of its Enzymatic and Antimicrobial Efficacy. *Tribhuvan University Journal of Microbiology*, 6(1), 113–118. doi:10.3126/tujm.v6i0.26594
- Patel, B. S., Solanki, B. R., y Mankad, A. U. (2021). Effect of eco-enzymes prepared from selected organic waste on domestic waste water treatment. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 10(1), 323–333. doi:10.30574/wjarr.2021.10.1.0159
- Permatananda, P. A. N. K., Pandit, I. G. S., Cahyawati, P. N., y Aryastuti, A. A. S. A. (2023). Antimicrobial properties of eco enzyme: a literature review. *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research*, 7(6), 3370-3376. doi:10.37275/bsm.v7i6.831
- Rahayu, M. R., Muliarta, I. N., y Situmeang, Y. P. (2021). Acceleration of Production Natural Disinfectants from the Combination of Eco-Enzyme Domestic Organic Waste and Frangipani Flowers (*Plumeria alba*). *SEAS (Sustainable Environment Agricultural Science)*, 5(1), 15–21. doi:10.22225/seas.5.1.3165.15-21
- Ramadani, A. H., Karima, R., y Ningrum, R. S. (2022). Antibacterial Activity of Pineapple Peel (*Ananas comosus*)

- Eco-enzyme Against Acne Bacteria (Staphylococcus aureus and Prapionibacterium acnes). *Indonesian Journal of Chemical Research*, 9(3), 201–207. doi: 10.30598/ijcr.2022.9-nin
- Rasit, N., Hwe Fern, L., y Ab Karim Ghani, W. A. W. (2019). Production and characterization of eco enzyme produced from tomato and orange wastes and its influence on the aquaculture sludge. *International Journal of Civil Engineering and Technology*, 10(3), 967–980. Recuperado de https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3456453
- Rocha e Silva, M. P., Almeida, C. G., Rocha e Silva, C. P., Luna, J. M., y Sarubbo, L. A. (2020). Formulation of a biodegradable detergent for cleaning oily residues generated during industrial processes. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(6), 1111-1123. doi:10.1002/jsde.12440
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., y Lobo, M. G. (2018). Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 512–531. doi:10.1111/1541-4337.12330
- Samriti, S. S., y Arya, A. (2019). Garbage enzyme: A study on compositional analysis of kitchen waste ferments. *The Pharma Innovation Journal*, 8(4), 1193-1197. Recuperado de www.thepharmajournal.com
- Saramanda, G., y Kaparapu, J. (2017). Antimicrobial Activity of Fermented Citrus Fruit Peel Extract. *Journal of Engineering Research and Application*, 7(11), 25–28. doi:10.9790/9622-0711072528
- Sunarsih, S., Mustikaningtyas, D., y Widiatningrum, T. (2024). Pengaruh bahan baku terhadap aktivitas antimikroba ekoenzim: systematic literature review. *In Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 12, 27-38.
- Teather, R. M., y Wood, P. J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, 43(4), 777-780. doi:10.1128/aem.43.4.777-780.1982
- Vama, L., y Cherekar, M. N. (2020). Production, extraction and uses of eco-enzyme using citrus fruit waste: Wealth from waste. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc*, 22(2), 346–351. Recuperado de <http://www.envirobiotechjournals.co>

m/AJMBES/v22i220/AJM-18.pdf

Welfalini, S. T., Suartha, I. N., y Sudipa, P.

H. (2022). Uji daya hambat eko-enzim terhadap perumbuhan bakteri *Streptococcus* spp. yang diisolasi dari jaringan ektodermal kulit anjing. *Buletin Veteriner Udayana Volume*, 15(2), 169-176.

doi:

10.24843/bulvet.2023.v15.i02.p02

Wulandari, W. S., y Winarsih, W. (2024).

Pengaruh Ekoenzim Berbagai Limbah Kulit Buah terhadap Penurunan Konsentrasi Surfaktan pada Air Limbah Laundry. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*, 13(1), 93-104. doi:

10.26740/lenterabio.v13n1.p93-104

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Tecnología Agroindustrial por facilitar la realización de parte de las evaluaciones experimentales. Extendemos nuestro agradecimiento a todas las personas e instituciones que contribuyeron de alguna manera al desarrollo de esta investigación.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Agencia Sueca de Cooperación Internacional para el Desarrollo (ASDI).

35.- Medio ambiente y contaminación ambiental

Dinámica de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga O157:H7 en modelos acuáticos

Autor: Calabro, Lola; lcabro@fvet.uba.ar

Co-autor(es): Blanco Crivelli, Ximena; Bentancor, Adriana

Orientadora: Bonino, María Paz; mail mpazbonino@fvet.uba.ar

Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones en Epidemiología Veterinaria (IIEV), Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Microbiología

Resumen

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) produce cuadros asintomáticos, diarreas agudas (DA) o diarreas agudas sanguinolentas (DAS), y síndrome urémico hemolítico (SUH). Su transmisión es fundamentalmente fecal-oral asociada a la ingestión de agua o alimentos contaminados. La presencia de *E. coli* en materia fecal y su habilidad de persistir en ambiente ha determinado su utilización como indicador en los análisis de calidad de agua. En el ambiente las cepas de *E. coli* cuentan con la capacidad de adaptarse e incluso persistir. El objetivo de este trabajo fue contribuir a la comprensión de la epidemiología de SUH, DA y DAS, determinando el comportamiento de una cepa STEC con impacto en salud en modelos acuáticos. Se realizaron ensayos con una cepa STEC O157:H7 en agua de mar, lluvia y río. Los modelos fueron autoclavados, inoculados por triplicado con suspensiones de la cepa STEC con concentración 1MF y permanecieron a 4°C. La persistencia de la cepa en cada modelo se estableció mediante determinación de la curva de muerte y la viabilidad. Se realizaron cuentas viables semanales en agar tripteína soya y determinación de viabilidad en caldo cerebro corazón (CCC), pruebas bioquímicas de identificación, y detección de *stx1*, *stx2* y *rfbO157* por PCR. En el agua de mar, la curva de muerte alcanzó las 5 semanas, persistiendo luego 4 semanas en CCC. Los modelos de agua río y lluvia superaron las 21 y 6 semanas de seguimiento respectivamente. Durante todo el ensayo, la cepa mantuvo sus características fenotípicas y genotípicas. Los resultados refuerzan la necesidad de considerar la persistencia ambiental de STEC como un factor clave en su transmisión y en la epidemiología de las enfermedades asociadas en la infancia.

Palabras clave: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, agua, persistencia

1. Introducción

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que se encuentra adaptado al intestino del hombre y animales de sangre caliente formando parte de su microbiota. Debido a procesos naturales de variabilidad genética adquirió factores de virulencia, a partir de los cuales surgieron nuevas cepas con capacidad de ser patógenas para el hospedador. Se utiliza el término patovar para hacer referencia al grupo de cepas de una misma especie que causan la misma enfermedad a través de factores de virulencia comunes. Dentro de los patovares con impacto en la niñez se destaca *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) (Trabulsi et al., 2002).

Las cepas STEC se caracterizan por su capacidad de producir toxinas citotóxicas, conocidas como toxina Shiga (Stx). Existen dos familias de Stx: Stx1 y Stx2, siendo Stx2 la mayormente asociada con enfermedad (Guth et al., 2010). La patogenia de STEC incluye cuadros asintomáticos, cuadros de diarreas agudas (DA) o diarreas agudas sanguinolentas (DAS), y síndrome urémico hemolítico (SUH), llegando en ocasiones a la muerte del paciente. El SUH afecta principalmente los niños menores de 5 años. Existen más de 400 serotipos de *E. coli* que pueden presentar la información necesaria para sintetizar la

toxina Shiga (Acuña y col., 2019). El serotipo STEC O157:H7 es el prototipo de este grupo de patógenos, representando el serotipo prevalente responsable de los cuadros clínicos más graves en humano (Rivas y col., 2023).

La problemática de SUH, DAS y DA engloba diferentes variables, conjugando junto con el agente al huésped y al ambiente. La principal vía de transmisión de STEC es la fecal-oral asociada a la ingestión de agua o alimentos crudos o elaborados contaminados (Gomez Duarte, 2014). El crecimiento de la población, la industrialización y el cambio climático, ejercen una continua presión sobre los recursos hídricos. De acuerdo con la OMS la mortalidad por enfermedades asociadas al agua excede los 5 millones de personas al año, y se destaca la ingestión de agua contaminada con material fecal humana o de animales (Cabral, 2010; Miliwebsky y col., 2016; World Health Organization). Debido a su importancia como patógenos se establecieron como indicadores de las características microbiológicas del agua potable a los coliformes totales, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Cabal y col., 2017; Gutiérrez y col., 2014). La presencia de *E. coli* en materia fecal y su habilidad de persistir en diferentes ambientes ha determinado su utilización como indicador fecal en los análisis de calidad de agua.

Este agente a su vez puede presentar un estilo de vida bifásico (fase asociada al huésped y fase huésped independiente).

En el ambiente, las condiciones son diferentes, y las cepas de *E. coli* ambientales cuentan con la capacidad de adaptarse y sobrevivir. Ante situaciones adversas como cambios extremos de temperatura, déficit nutricional, alteraciones en la disponibilidad de oxígeno, se ha descrito que este microorganismo puede adoptar un estado de latencia conocido como viable no cultivable (VNC) (Pienaar y col., 2016), durante el cual algunas cepas son incluso capaces de producir toxina (Liu y col., 2017). Las células VNC no pueden ser recuperadas utilizando medios de cultivo de rutina, pero mantienen actividad metabólica e integridad de membrana celular, y pueden ser resucitadas al revertir las condiciones que generaron estrés (Oliver, 2010; Pienaar y col., 2016). El presente trabajo se planteó con el propósito de aportar datos acerca de las diarreas producidas por *E. coli* y su relación con la contaminación ambiental. Se hipotetiza que las cepas STEC pueden persistir en ambientes acuáticos, siendo una fuente de infección y de factores de virulencia, constituyendo un riesgo para la población.

2. Objetivo

El objetivo general de este trabajo fue contribuir a la comprensión de la epidemiología de SUH, DA y DAS de impacto en la infancia, determinando el comportamiento de una cepa STEC con

impacto en salud en modelos acuáticos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Modelos acuáticos

Se recolectó agua de lluvia de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, agua de mar de la zona de Mar del Plata y agua del río Areco. Cada modelo acuático se colocó en tubos Falcon de 50 ml y fueron esterilizados en autoclave. Se trabajó con la cepa STEC O157:H7 #D2253, del Statens Serum Institute. Los modelos fueron inoculados por triplicado con una suspensión de la cepa STEC equivalente al 1 MF, determinada por absorbancia (0.257). La dosis del inóculo se estableció mediante cuenta viable. Los modelos fueron mantenidos en ambiente controlado a una temperatura 4°C.

3.2. Persistencia de la cepa en estudio

La persistencia de la cepa en estudio en cada modelo se estableció mediante determinación de la curva de muerte y la viabilidad de la misma.

3.2.1. Curva de muerte

Se realizaron a partir de cada modelo cuentas viables por diluciones sucesivas 1/10 en agar tripteína soya (ATS).

3.2.2. Viabilidad

Al no detectarse crecimiento en placa, se evaluó viabilidad mediante la inoculación de 0,1 ml del modelo en Caldo Cerebro Corazón (CCC). El caldo fue incubado por 48 h a 37°C, para determinar desarrollo visible mediante turbidez.

3.3 Evaluación fenotípica

En el transcurso de los ensayos, la cepa STEC fue caracterizada mediante morfología y afinidad tintorial utilizando coloración de Gram. Además, para su identificación se realizaron pruebas bioquímicas clásicas: oxidasa, catalasa, oxido-fermentación de la glucosa, fermentación de lactosa, producción de indol, vías fermentativas ácido mixta (Rojo de Metilo) o butilenglicólica (Voges Proskauer), y citrato de Simmons. Tanto la caracterización fenotípica como las pruebas bioquímicas se realizaron a partir de las colonias desarrolladas en la placa de ATS utilizada para el recuento viable en la construcción de la curva de muerte, y cuando fue necesario, a partir del desarrollo en CCC, habiéndose verificado la pureza de este en ATS.

3.4 Evaluación genotípica

La presencia de los genes marcadores de virulencia (*stx1*, *stx2*, *rfbO157*) se evaluó en todas las etapas mediante PCR múltiple (Leotta y col, 2005). El ADN se extrajo a partir de las colonias desarrolladas en la placa de ATS utilizada para el recuento viable en la construcción de la curva de muerte y cuando fue necesario, a partir del desarrollo en CCC.

4. Resultados y Discusión

Se generaron 3 modelos acuáticos a partir de agua de río, mar y lluvia, conformados por tres tubos Falcon de 40 ml cada uno. En el modelo de agua de mar, la curva de muerte alcanzó una duración de 5

semanas, persistiendo luego 4 semanas más en las que solo se obtuvo desarrollo al cultivar en CCC. Durante todo el ensayo, la cepa inoculada mantuvo sus características fenotípicas y genotípicas. Los modelos de agua río y lluvia superaron las 21 y 6 semanas de seguimiento respectivamente. Hasta el momento, en ambos modelos la cepa STEC ha mantenido tanto sus características fenotípicas y genotípicas. La presencia de *E. coli* O157:H7 y otros serotipos de STEC en distintos sistemas acuáticos, incluidos piscinas, lagunas, aguas residuales, lagos, océanos y ríos, los cuales pueden actuar como reservorios de estas bacterias ha sido previamente documentada (Blanch y col., 2003; Casas y col., 2006; Chern y col., 2004; Mauro y Koudelka, 2011; McCarthy y col., 2001; Muniesa y Jofre, 2000). En el ambiente, *E. coli* debe enfrentar diversas situaciones de estrés como variaciones de temperatura, bajo contenido de materia orgánica, alta salinidad, radiación solar y predación por parte de otros microorganismos, pero tiene la capacidad de adaptarse e incluso y multiplicarse (Ishii y Sadowsky, 2008). Los ensayos de persistencia realizados en este trabajo sugieren que *E. coli* puede sobrevivir en diferentes modelos hídricos y ser detectada durante períodos prolongados aún en condiciones desfavorables. Este resultado coincide con los de Saima y col. (2021), quienes observaron persistencia

de cinco cepas de *E. coli* en modelos de agua destilada, río, mar y estanque, encontrando una persistencia que variaba entre 4 a 33 semanas. Asimismo, LeJeune y col. (2001) y Polifroni y col. (2014) estudiaron la sobrevivencia de STEC en agua de bebedero de corrales de bovinos observando que la misma se extendió entre 70 y 240 días. No hay registros hasta nuestro conocimiento de estudios de persistencia de STEC O157:H7 en agua de lluvia.

En los ensayos de persistencia en agua de mar, la cepa STEC se mantuvo viable durante un mes en CCC, aun cuando no se observaron colonias en ATS, lo que sugiere que la suplementación nutricional de los medios líquidos podría atenuar el estrés bacteriano. Sin embargo, para establecer si esta condición corresponde a un verdadero estado VNC y no simplemente a una baja carga bacteriana, serán necesarios estudios adicionales. Este fenómeno, descrito en más de 60 especies bacterianas (Ding et al., 2017), aún plantea interrogantes sobre si constituye una estrategia de resistencia frente a condiciones adversas o un estadio transitorio previo a la muerte celular (Ohtomo & Saito, 2001). La confirmación de la viabilidad de células VNC requiere métodos alternativos, como el análisis de integridad de membrana o la PCR (Oliver, 2010). Este estadio reviste especial importancia sanitaria, ya que, al no ser detectables por los métodos

convencionales basados en el desarrollo en medios de cultivo, representan un riesgo oculto para la salud pública (Pienaar et al., 2016). Además, las bacterias en estado VNC pueden recuperar su capacidad de crecimiento en condiciones de laboratorio específicas e incluso tras la ingestión por el huésped (Bentancor et al., 2023).

Los microorganismos obtenidos a partir de los tres modelos fueron capaces de mantener sus características metabólicas durante todo el ensayo, y al evaluar la virulencia de la cepa se observó que también fue capaz de conservar los genes que codifican tanto para Stx 1 como Stx 2. Esta tendencia también se observó al analizar la cepa del modelo de mar en su etapa de desarrollo exclusivo en CCC, acercándose a un posible estado VNC. Esto coincide con otros autores que esgrimen que las bacterias VNC mantienen su actividad metabólica (Oliver, 2005; Fakruddin y col., 2013; Oliver, 2010; Pinto y col., 2013). Al evaluar la virulencia incluso durante el estadio de VNC, Oliver (2005) observó que las células VNC expresan sus toxinas. Asimismo, Liu y col. (2010) detectaron mediante RT-PCR una mayor expresión de *stx1* y *stx2* en el estadio de VNC comparado con el estadio cultivable.

La persistencia de la cepa en los modelos acuáticos podría deberse a la producción de biofilm. Se conoce que *E. coli* puede formar biofilm, lo que incrementa

notablemente su resistencia al estrés ambiental (Zhou y col., 2022). Ballesté y col. (2024) han descripto previamente la adhesión a plásticos en ambientes marinos, la cual no fue alterada por los factores ambientales externos. Por su parte Saima y col. (2021) observaron que cepas VNC persistentes en agua tenían la capacidad de producir biofilm. Es de interés evaluar la capacidad de la cepa STEC O157:H7 #D2253 de formar biofilm a 4 °C, temperatura en la que se realizaron los ensayos.

En el presente estudio se emplearon modelos estériles a los que se añadió la bacteria en análisis, constituyendo un primer acercamiento a las condiciones ambientales. Sin embargo, es necesario considerar que la presencia de otras bacterias puede influir de manera significativa en la persistencia de STEC en ecosistemas acuáticos. En este sentido, Mauro y col. (2013) evaluaron la persistencia de STEC en microcosmos acuáticos que incluían otras cepas STEC y diferentes microorganismos, observando que dichas interacciones podían aumentar o disminuir la persistencia del patógeno.

5. Conclusiones

Los resultados resaltan la importancia de considerar la persistencia ambiental de STEC como un factor clave en su transmisión y en la epidemiología de las enfermedades asociadas a la infancia. En el marco de la interfase humano–animal–

ambiente, el estudio de cepas STEC en modelos acuáticos, junto con el análisis de sus factores de virulencia, dinámica y capacidad de persistencia, constituye una herramienta valiosa para comprender su origen, las posibles vías de transmisión y su impacto en la salud pública.

6. Bibliografía

- Acuña, P., Rojas, N., Florentin, M., Rodriguez, F. (2019). Estandarización de una técnica de PCR múltiple para la detección de los serogrupos O157, O104 y “big six” de *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC). Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 17(2): 71-76.
- Ballesté, E., Liang, H., Migliorato, L., Sala-Comorera, L., Méndez, J., & Garcia-Aljaro, C. (2024). Exploring plastic biofilm formation and *Escherichia coli* colonisation in marine environments. Environmental Microbiology Reports. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13308>
- Bentancor, A., Blanco Crivelli, X., Piccini, C., & Trueba, G. (2023). New concepts on domestic and wild reservoirs and transmission of *E. coli* and its environment. In A. G. Torres (Ed.), Trending topics in *Escherichia coli* research: The

- Latin American perspective (2nd ed., pp. 55–72). Springer.
- Blanch, A. R., Garcia-Aljaro, C., Muniesa, M., & Jofre, J. 2003. Detection, enumeration and isolation of strains carrying the *stx2* gene from urban sewage. *Water Sci. Technol.* 47:109–116.
 - Cabal, A., Vicente, J., Álvarez, J., Barasona, J. A., Domínguez, L., & Gortázar, C. (2017). Human influence and biotic homogenization drive the distribution of *Escherichia coli* virulence genes in natural habitats. *MicrobiologyOpen*, 6(3), e445. <https://doi.org/10.1002/mbo3.445>
 - Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
 - Casas, V., Miyake, J., Balsley, H., Roark, J., Telles, S., Leeds, S., Zurita, I., Breitbart, M., Bartlett, D., Azam, F., & Rohwer, F. 2006. Widespread occurrence of phage-encoded exotoxin genes in terrestrial and aquatic environments in Southern California. *FEMS Microbiol. Lett.* 261:141–149
 - Chern, E. C., Tsai, Y. L., & Olson, B. H. 2004. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:356–362.
 - Ding, T., Suo, Y., Xiang, Q., Zhao, X., Chen, S., Ye, X., & Liu, D. (2017) Significance of viable but nonculturable *Escherichia coli*: induction, detection, and control. *J Microbiol Biotechnol*, 27(3):417-28.
 - Fakruddin, M., Mannan, KSB, & Andrews, S. (2013) Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN Microbiol*, 2013: 1-6.
 - Gómez-Duarte, O. G. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 521–529. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500010>
 - Guth, B.E.C, Prado, V., & Rivas, M. (2010) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. En Torres, A.G. (Ed) *Pathogenic Escherichia coli in Latin America* (pp. 65-83). Bentham Science Publishers, U.S.A.
 - Gutiérrez, D., Juárez, M. F., Poma, H. R., Garcé, B., & Rajal, V. (2014). Quantification of parasites in aquatic environments in the Province of Salta, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*,

- 46(2), 150–160.
[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70064-1](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70064-1)
- Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2008). *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 23(2), 101–108. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.101>
 - LeJeune, J. T., Besser, T. E., & Hancock, D. D. (2001). Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3053-3057.
 - Leotta, G., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I.C., Motter, M., Ferrer, M., Marey, E., & Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología*, 37: 1-10.
 - Liu, Y., Wang, C., Tyrrell, G., & Li, X. F. (2010) Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Water Res* 44: 711-8
 - Liu, J., Zhou, R., Li, L., Peters, B. M., Li, B., Lin, C., Chuang, T. L., Chen, D., Zhao, X., Xiong, Z., Xu, Z., & Shirtliff, M. E. (2017) Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation. *Res Microbiol* 168(3):188–193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.11.002>
 - Mauro, S. A., & Koudelka, G. B. 2011. Shiga toxin: expression, distribution, and its role in the environment. *Toxins* 3:608–625.
 - Mauro, S. A., Opalko, H., Lindsay, K., Colon, M. P., & Koudelka, G. B. (2013). The microcosm mediates the persistence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in freshwater. *Appl Environ Microbiol* 2013 79(16):4821-8. doi: 10.1128/AEM.01281-13.
 - McCarthy, T. A., Barrett, N. L., Hadler, J. L., Salsbury, B., Howard, R. T., Dingman, D. W., Brinkman, C. D., Bibb, W. F., & Cartter, M. L. 2001. Hemolyticuremic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut. *Pediatrics* 108:E59. doi:10.1542/peds.108.4.e59.
 - Miliwebsky, E., Schelotto, F., Varela, G., Luz, D., Chinen, I., & Piazza, R. M. F. (2023). Human diarrheal infections: Diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. En A. G. Torres (Ed.), *Escherichia coli* in the Americas (pp. 343–369). Springer
 - Muniesa, M., & Jofré, J. (2000). Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying

- the Stx2 gene in sewage from different countries. FEMS Microbiology Letters, 183(1), 197–200.
- Ohtomo, R., & Saito, M. (2001). Increase in the culturable cell number of *Escherichia coli* during recovery from saline stress: possible implication for resuscitation from the VBNC state. Microbial Ecology, 42(2), 208–214. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-0019-9>
 - Oliver, JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. Journal of Microbiology, 43: 93-100.
 - Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 34(4), 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
 - Pienaar, J. A., Singh, A., & Barnard, T. G. (2016). The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review. African Journal of Laboratory Medicine, 5(1), a368. <https://doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.368>
 - Pinto, D., Santos, M. A., & Chambel, L. (2015). Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. Critical Reviews in Microbiology, 41(1), 61–76. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.794127>
 - Polifroni, R., Etcheverría, A. I., Arrollo, G. H., & Padola, N. L. (2014). Supervivencia de VTEC O157 y no-O157 en agua de bebederos y materia fecal de bovinos. Revista Argentina de Microbiología, 46(2), 126-132.
 - Rivas, M., Pichel, M., Colonna, M., López Casanello, A., Alconcher, L. F., Galavotti, J., Principi, L., Pérez Araujo, S., Ramírez, F. B., González, G., Pianciola, L. A., Mazzeo, M., Suarez, Á., Oderiz, S., Ghezzi, L. F. R., Arrigo, D. J., Paladini, J. H., Baroni, M. R., Pérez, S., & Tamborini, A. (2023). Surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated bloody diarrhea in Argentina. Revista Argentina de Microbiología, 55(4), 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.004>
 - Saima, U., Alam, M., & Akter, S. (2021). Survival of *Escherichia coli* in water microcosm study and rethinking its use as indicator. Microbiology, 90, 247–260. <https://doi.org/10.1134/S0026261721020107>
 - Trabulsi, L.R., Keller, R., & Gomez, T.A.T. (2002) Typical and atypical

enteropathogenic *Escherichia coli*.

Emerging and Infectious Disease,
8, 508-13.

- World Health Organization. (2013, enero 26). Water quality and health strategy 2013–2020. Recuperado de https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2013/water_quality_strategy/en/
- Zhou, F., Wang, D., Hu, J., Zhang, Y., Tan, B. K., & Lin, S. (2022). Control measurements of *Escherichia coli* biofilm: A review. Foods, 11(16), 2469. <https://doi.org/10.3390/foods11162469>

7. Financiamiento

- UBACyT 20020220400123BA

Evaluación del grado de contaminación ambiental en zonas balnearias por coliformes y cepas diarreogénicas de *Escherichia coli* con impacto en Salud.

- Lola Calabro actualmente posee una beca UBACyT estímulo (REREC-2024-187A-E-UBA-REC).

D. Eje Ciencias de la Vida. 39. Salud Humana

FRECUENCIA DE ANEMIA EN EMBARAZADAS QUE ACUDEN A DOS HOSPITALES PÚBLICOS ALTO PARANÁ, 2024

Autor: Rivas Britez, Daisy María; e.mail: dairivas0895@gmail.com

Co-autores: Almada Ruiz Diaz, Katia Maiza; Vera Villalba; Arami Aracely;

Cardozo Avalos, Cynthia Carolina; Leguizamón Meza, Nunila Beatriz.

Orientadores/as: Santacruz, Lorena; Gimenez, Andrea; e.mail: loresantacruz87@gmail.com

RESUMEN

Antecedentes: La anemia es una condición que altera el sistema inmunológico de las embarazadas debido al aumento del volumen sanguíneo y crecimiento del feto, lo que conlleva a la disminución de la hemoglobina. **Objetivo:** Describir la frecuencia de anemia en embarazadas que acuden a dos hospitales públicos del Alto Paraná, en el 2024. **Materiales y métodos:** el estudio es descriptivo y prospectivo. Se incluyeron embarazadas desde el primer trimestre de gestación con previo consentimiento informado. El estudio de sangre realizado fue el hemograma y se analizaron parámetros de la serie eritrocitaria. Se aplicó un cuestionario propio del Laboratorio para la recolección de datos sociodemográficos y clínicos. **Resultados:** De 138 gestantes, el 13,8% presentó anemia, en su mayoría entre el rango de edad de 21 a 30 años y en el tercer trimestre de embarazo. Predominó la anemia leve (53%) sobre la moderada (47%). **Discusión:** La anemia en el embarazo fue más frecuente en mujeres jóvenes y en etapas avanzadas de gestación, lo cual coincide con hallazgos de estudios regionales. Se resalta la importancia del control prenatal y la suplementación con hierro.

Palabras clave: anemia, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, índices eritrocitarios, gestación.

INTRODUCCIÓN

La anemia, definida como una disminución en la concentración de hemoglobina en la sangre, representa un problema de salud pública a nivel mundial. Su causa más frecuente es la deficiencia de hierro, responsable de más del 50% de los casos. Otras causas incluyen deficiencias nutricionales de ácido fólico, vitamina B12 y vitamina A, así como enfermedades infecciosas como parasitosis, tuberculosis y VIH/SIDA. La anemia se clasifica habitualmente según los niveles de hemoglobina y constituye un importante indicador de malnutrición y de condiciones de salud desfavorables (Chauca Arce, 2023; Díaz-Granda, 2021; Espitia de la Hoz & Orozco Santiago, s.f.; Gonzales & Olavegoya, 2019; OMS, 2020). Esta condición puede afectar a personas de todas las edades, aunque los grupos más vulnerables son los niños menores de 5 años y las mujeres embarazadas. Durante la gestación, especialmente en el segundo trimestre, la demanda de hierro se incrementa significativamente debido a la formación de la placenta y al crecimiento fetal, lo cual puede provocar una disminución de la hemoglobina (OMS, 2001, 2020). En sus formas leves, la anemia puede manifestarse con síntomas como fatiga, debilidad, mareos, cefalea y palidez cutánea. En los casos más

severos, pueden presentarse taquicardia, hipotensión y disnea. Las complicaciones durante el embarazo son de gran relevancia clínica. Las gestantes pueden desarrollar alteraciones cardiovasculares, mayor susceptibilidad a infecciones y riesgo elevado de hemorragias durante el embarazo, el parto o el posparto, lo cual puede requerir transfusiones sanguíneas. En cuanto al recién nacido, la anemia materna puede predisponer a anemia neonatal y a trastornos del crecimiento y desarrollo (Alegría Guerrero & González Medina, 2021; Blacio Rivas et al., 2019). El hemograma es una herramienta fundamental en la evaluación de la sangre, ya que permite estudiar las tres líneas celulares (eritrocitaria, leucocitaria y plaquetaria). Para el estudio de anemias, los parámetros utilizados son de la serie eritrocitaria: recuento de glóbulos rojos (GR), hematocrito (HTO), hemoglobina (Hb) e índices eritrocitarios (VCM, HCM, CHCM y RDW). Según los valores de hemoglobina, la Organización Mundial de la Salud clasifica la anemia en embarazadas como leve (10,0–10,9 g/dL), moderada (7,0–9,9 g/dL) y grave (<7,0 g/dL) (OMS, 2001, 2020). La OMS estima que más de 1.620 millones de personas padecen anemia. En 2016, la prevalencia en mujeres en edad reproductiva alcanzó

el 33%, es decir, aproximadamente 613 millones de casos, donde las regiones más afectadas fueron África Central y Asia (OPS, 2022; WHO, 2001). A nivel global, la incidencia de anemia en el embarazo presenta una gran variabilidad. En países en desarrollo puede llegar al 50%, mientras que en América Latina oscila entre el 20% y el 39% (OPS, 2022; Pérez Facio, 2022; Vega, 2022). En 2011, un estudio realizado en la región norte de Etiopía reportó una prevalencia de anemia del 10% en mujeres embarazadas, con una distribución del 64,3% de casos leves, 32% moderados y 4% severos. En Maracaibo, Venezuela, un estudio de 2015 evidenció niveles promedio de hemoglobina de 8,4 g/dL y hematocrito de 28,8% en embarazadas cuyos recién nacidos presentaban bajo peso al nacer. En Brasil, en el mismo año, la prevalencia de anemia gestacional fue del 53,7%, de la cual el 79,3% correspondía a anemia leve y el 20,7% a anemia moderada (Gaona et al., 2019; Osakada et al., 2022). En Paraguay, un estudio realizado en el Hospital Regional de Coronel Oviedo, con una muestra de 110 gestantes, evidenció una prevalencia de anemia del 32,7%. La mayoría de las participantes eran primigestas y se encontraban en el tercer trimestre de gestación (Cáceres et al., 2020). En el departamento de Alto Paraná, el Hospital Materno Infantil Los Ángeles de Ciudad del

Este es un centro de referencia para la atención de mujeres embarazadas. Entre 2018 y 2021, se registraron 24.788 consultas prenatales, y hasta el año 2023 se asistieron más de 50.000 partos. Así también, se contó con una buena participación de gestantes que asistían a su vez en el Hospital Distrital de Minga Guazú e intercambiaban entre los dos hospitales públicos. Sin embargo, no existen estudios publicados sobre la prevalencia de anemia en embarazadas en esta región. Ante esta situación, el presente estudio busca aportar evidencia local que sirva de base para fortalecer programas de suplementación con hierro, campañas de educación nutricional y estrategias de seguimiento prenatal para prevenir y tratar la anemia en este grupo vulnerable. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue describir la frecuencia de anemia en embarazadas que acuden a dos hospitales públicos de Alto Paraná en 2024.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación es de tipo descriptivo, de corte transversal con un diseño prospectivo y un enfoque cuantitativo. La población de interés estuvo conformada por mujeres embarazadas atendidas en el Hospital Materno Infantil Los Ángeles de Ciudad del Este y el Hospital Distrital de Minga Guazú.

La población accesible fue aquella que acudió a consulta prenatal durante el periodo de setiembre a octubre del 2024. Se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. La muestra estuvo compuesta por embarazadas mayores de edad, en cualquier trimestre del embarazo, que accedieron voluntariamente a participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado. Se excluyeron aquellas gestantes que presentaban enfermedades hematológicas previas diagnosticadas, mujeres menores de edad y aquellas que no completaron el formulario o se encontraban incompletos. Para la recolección de datos sociodemográficos y clínicos se utilizó una encuesta estructurada desarrollada en un formulario de Google para evaluar variables como la edad expresada en años, número de hijos, procedencia, antecedentes de anemia (diagnóstico previo de anemia antes o durante el embarazo actual), la edad gestacional (tiempo de embarazo expresado en semanas), consumo actual de medicamentos o suplementos con hierro. Para los datos de los parámetros hematológicos se tomaron muestras de sangre venosa obtenidas en condiciones de ayuno mínimo de 8 horas, posteriormente recolectadas en tubos con anticoagulante EDTA (1–2 mL), homogeneizadas por inversión y

trasladadas para su procesamiento al Laboratorio de Análisis Clínicos del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Ciencias de la Salud (FACISA – UNE), cumpliendo con las normas de bioseguridad para transporte de muestras. Se utilizó un contador hematológico automatizado, que emite un informe estándar y se obtuvieron las variables de los parámetros de la serie eritrocitaria (Hb, HTO, GR, VCM, HCM, CHCM y RDW). Los datos recolectados fueron cargados en una base de datos elaborada en Microsoft Excel, verificando la calidad de carga mediante doble revisión. Se aplicó estadística descriptiva (frecuencias absolutas y relativas porcentuales) para caracterizar las variables sociodemográficas y clínicas, así como para describir la frecuencia y gravedad de la anemia según los valores de hemoglobina. Para la clasificación de la anemia se tuvo en cuenta los valores para embarazadas según la OMS (leve: 10,0 – 10,9 g/dL, moderada: 7,0 – 9,9 g/dL, grave: < 7,0 g/dL). Se respetaron los principios éticos de la investigación en seres humanos, con la participación voluntaria, confidencialidad de los datos, y la obtención del consentimiento informado previo. El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética Institucional (CEI) de la Facultad de Ciencias de la Salud de la

Universidad Nacional del Este, bajo el dictamen N° 10/2024.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 138 gestantes que acudieron a sus controles prenatales en dos hospitales públicos del Alto Paraná. De los cuales, el 57,2 % se encontraban en el rango de 21 a 30 años. El 56,5% residen en CDE y el 26,1% residen en Minga Guazú y la mayoría provienen de zonas urbanas. (Figura 1,2,3).

Figura 1. Distribución de las embarazadas según grupos etarios.

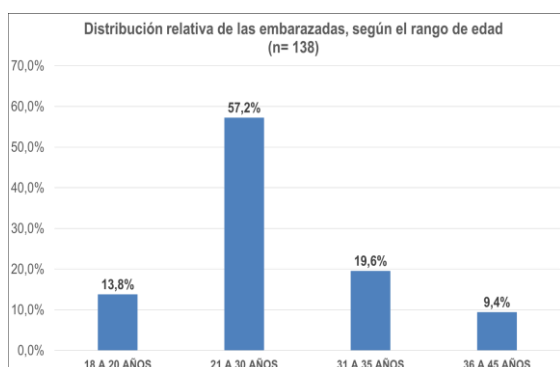


Figura 2. Distribución de las embarazadas según lugar de residencia.

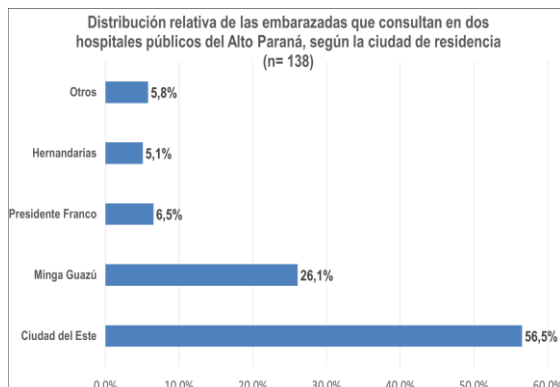
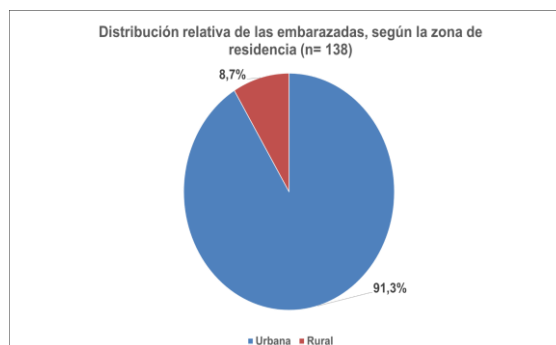


Figura 3. Distribución de las embarazadas según procedencia urbana o rural.



Según la cantidad de hijos se observa que el 54,3 % de las gestantes referían tener 1 a 2 hijos y que la mayoría se encontraban en el tercer trimestre del embarazo, concentrando el 52,2%. (Figura 4,5).

Figura 4. Distribución de las embarazadas según número de hijos.

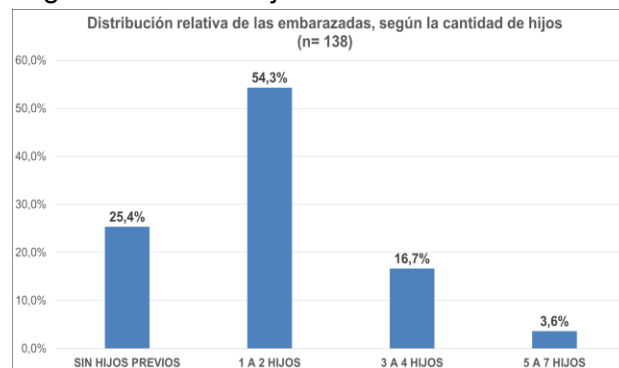
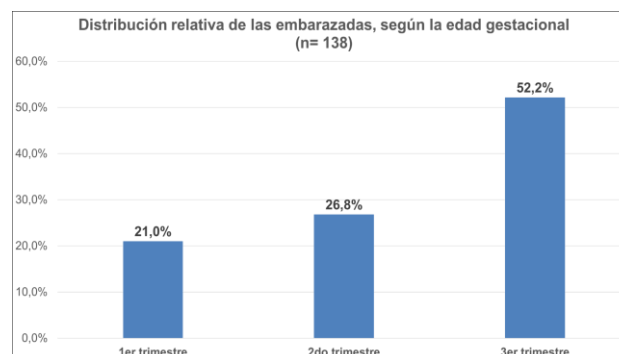
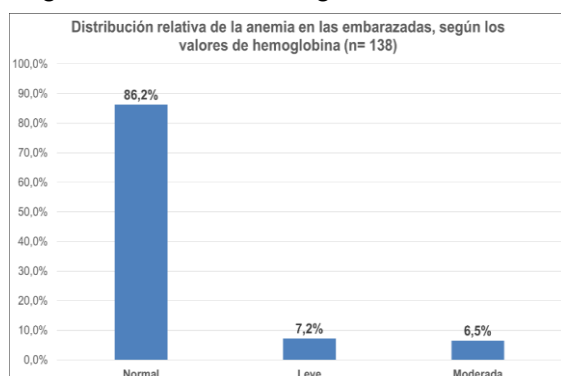


Figura 5. Distribución de las embarazadas según edad gestacional.



Según los valores de hemoglobina se observa que el 86,2% de las embarazadas tienen hemoglobina del valor normal, pero también se presentaron anemia leve de 7,2% y anemia moderada de 6,5% (Figura 6).

Figura 6. Distribución de las embarazadas según valores de hemoglobina.



En el primer trimestre, el 10,5% de las embarazadas presentó anemia leve y el 15,7% anemia moderada. En el segundo trimestre, se observó anemia leve en el 15,7% y anemia moderada en el 10,5%. En el tercer trimestre, el 26,3% de las embarazadas presentó anemia leve y el 21,0% anemia moderada. Del total de los casos anémicos, el 47,3% se concentró en el tercer trimestre. En la tabla 1 se observa la distribución de los casos de embarazadas anémicas en relación con la edad gestacional.

Tabla1. Distribución de embarazadas con anemia según tipo y edad gestacional (n = 19).

Hemoglobina	Edad gestacional						Total	
	1er Tri.		2do Tri.		3er Tri.			
	n= (5)	%	n= (5)	%	n= (9)	%	n= (19)	%
Leve (10,0 – 10,9 g/dL)	2	10,5	3	15,7	5	26,3	10	53
Moderada (7,0 – 9,9 g/dL)	3	15,7	2	10,5	4	21,01	9	47
Grave (< 7,0 g/dL)	0	0	0	0	0	0	0	0

DISCUSIÓN

La prevalencia de anemia en embarazadas en este estudio fue del 13,8%, cifra inferior a la reportada en países de África y Asia, donde puede alcanzar hasta el 50% (Gaona et al., 2019; Osakada et al., 2022). En América Latina, la prevalencia de anemia en el embarazo oscila entre el 20% y el 39% (OPS, 2022; Pérez Facio, 2022; Vega, 2022). En Paraguay, un estudio realizado en el Hospital Regional de Coronel Oviedo reportó una prevalencia del 32,7%, superior a lo encontrado en nuestro trabajo (Cáceres et al., 2020).

En cuanto a la edad materna, los resultados mostraron mayor frecuencia de embarazadas entre 21 y 30 años, lo cual concuerda con lo observado en investigaciones realizadas en otros países de la región (Blacio Rivas et al., 2019; Chauca Arce, 2023). Respecto al número de hijos, se observó un predominio de mujeres con 1 a 2 hijos, lo que coincide con lo descrito en la literatura, donde la multiparidad se relaciona con mayor riesgo de anemia (Alegría Guerrero & González Medina, 2021).

En relación con la edad gestacional, la mayoría de los casos de anemia se concentraron en el tercer trimestre, lo cual coincide con hallazgos de estudios en Brasil y Venezuela (Gaona et al., 2019;

Meléndez et al., 2021). Esto se explica porque en esta etapa aumenta la demanda de hierro debido al crecimiento fetal y la expansión del volumen sanguíneo materno (OMS, 2020).

En cuanto al grado de severidad, predominó la anemia leve (7,2%), seguida de anemia moderada (6,5%). Estos resultados son consistentes con lo informado en otros países, donde la anemia leve es la forma más frecuente durante la gestación (Osakada et al., 2022; Vega, 2022). No obstante, la presencia de casos de anemia moderada es clínicamente relevante, ya que puede asociarse con complicaciones maternas como hemorragias y mayor susceptibilidad a infecciones, así como con consecuencias fetales como bajo peso al nacer y prematuridad (Pérez Facio, 2022; Sánchez Vera et al., 2021).

Nuestros hallazgos aportan evidencia local relevante sobre anemia en embarazadas en el departamento de Alto Paraná. Estos resultados refuerzan la importancia de fortalecer las estrategias de suplementación con hierro, programas de educación nutricional, un seguimiento hematológico y prenatal oportuno, orientar a las gestantes jóvenes (21 a 30 años) sobre la prevención de la anemia. Así

mismo sugiere una vigilancia continua de la anemia en el tercer trimestre con el fin de reducir la prevalencia de anemia y sus complicaciones en la población materna y neonatal.

CONCLUSIÓN

La prevalencia de anemia en embarazadas atendidas en dos hospitales públicos del Alto Paraná en 2024 fue inferior a la reportada en otras regiones de Paraguay y América Latina, aunque se concentró principalmente en el tercer trimestre y se presentó mayormente en forma leve. Estos hallazgos confirman que la anemia durante la gestación continúa siendo un problema relevante de salud materna, con riesgo de complicaciones tanto para la madre como para el recién nacido.

REFERENCIAS

Alegría Guerrero, M. A., & González Medina, M. A. (2021). *Anemia en mujeres embarazadas: factores de riesgo y repercusiones materno-fetales*. Revista Científica de la Sociedad Española de Ginecología, 45(2), 123–130.

Blacio Rivas, M., Méndez, P., & Ortega, L. (2019). *Anemia en gestantes: prevalencia y factores asociados*. Revista Médica del Ecuador, 31(1), 22–28.

Cáceres, M., López, J., & Aguilera, G. (2020). *Prevalencia de anemia en embarazadas del Hospital Regional de Coronel Oviedo*. Revista Paraguaya de Ciencias de la Salud, 8(2), 45–52.

Chauca Arce, D. (2023). *Anemia en el embarazo: revisión de la literatura reciente*. Revista Peruana de Obstetricia y Ginecología, 69(3), 178–185.

Espitia de la Hoz, F. J., & Orozco Santiago, J. (s.f.). *Deficiencias nutricionales y anemia en el embarazo*. Universidad de Córdoba.

Gaona, A., Silva, C., & Rojas, M. (2019). *Prevalencia de anemia en gestantes atendidas en hospitales de Brasil*. Revista Latinoamericana de Obstetricia, 37(2), 56–62.

Gonzales, G. F., & Olavegoya, P. (2019). *Factores asociados a anemia en mujeres en edad reproductiva*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 36(1), 123–130.

Meléndez, C., Gutiérrez, A., & Ramírez, E. (2021). *Anemia gestacional y factores de riesgo en embarazadas venezolanas*. Revista Venezolana de Salud Pública, 45(1), 31–39.

OMS. (2001). *Iron deficiency anaemia: Assessment, prevention and control. A guide for programme managers*.

Organización Mundial de la Salud.

https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/

OMS. (2020). *Worldwide prevalence of anaemia 1993–2019*. Organización Mundial de la Salud.
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240016011>

OPS. (2022). *Anemia en mujeres en edad reproductiva en las Américas*. Organización Panamericana de la Salud.
<https://www.paho.org/es/anemia>

Osakada, M., Torres, P., & Silva, R. (2022). *Prevalencia de anemia en gestantes brasileñas y factores asociados*. Revista

Brasileira de Saúde Materno Infantil, 22(4), 310–318.

Pérez Facio, M. (2022). *Anemia en el embarazo: causas, prevalencia y consecuencias*. Revista Chilena de Obstetricia, 87(2), 97–104.

Sánchez Vera, M., López, G., & Paredes, R. (2021). *Complicaciones de la anemia moderada en mujeres embarazadas*. Revista Cubana de Salud Pública, 47(3), e353.

Vega, A. (2022). *Epidemiología de la anemia gestacional en América Latina: revisión sistemática*. Revista Argentina de Hematología, 41(2), 105–115.

37.- Agroalimentos

Efecto de la aplicación de tres microorganismos benéficos en el cultivo de Melón (*Cucumis melo* L.)

Autora: Barreto, Diana; diana160802@hotmail.com

Orientador: Ortíz Acosta, Orlando; orlantiz@gmail.com

Universidad Nacional del Este/Facultad de Ingeniería Agronómica

Resumen

El cultivo de melón es un rubro alternativo de renta para el pequeño productor, hecho que se fundamenta en el crecimiento de las superficies cultivadas y también de las mejoras del mismo. El uso de microorganismos es una estrategia de manejo y una alternativa sostenible en la producción. El objetivo del trabajo es evaluar el efecto de la aplicación de *Trichoderma sp.*, *Azospirillum brasilense* y *Bacillus spp.* en el cultivo del melón. La investigación se realizó en el Centro de Investigación Agropecuaria y Ambiental (CIAA- FIA UNE), con un diseño en bloques completos al azar, con ocho tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos fueron T1: testigo; T2: *Trichoderma sp.*; T3: *Azospirillum brasilense*; T4: *Bacillus spp.*; T5: *Trichoderma sp.* + *Azospirillum brasilense*; T6: *Trichoderma sp.* + *Bacillus spp.*; T7: *Azospirillum brasilense* + *Bacillus spp.*; T8: *Trichoderma sp.* + *Azospirillum brasilense* + *Bacillus spp.* Las variables evaluadas fueron longitud total de ramas, longitud de raíz, cantidad de frutos y rendimiento. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza (AgroEstat) y comparación de medias con test de Tukey al 5% y demostraron que hubo diferencias estadísticas significativas en longitud de raíz, con un coeficiente de variación de 12,3% y un DMS de 13,2% en la comparación de medias. Siendo el T7 estadísticamente superior al T5, T1, T4 y T2, pero estadísticamente igual al T3, T6 y T8, por lo que la combinación de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus spp.* influye estadísticamente en la longitud de la raíz. Mientras que, en longitud total de ramas, cantidad de frutos y rendimiento no hubo diferencias estadísticas significativas.

Palabras clave: Melón, promotores de crecimiento, bioestimulantes.

Introducción

El melón es una fruta tropical cuyo cultivo actualmente es un rubro alternativo de renta para el pequeño productor, hecho que se fundamenta en el crecimiento de las superficies cultivadas y también de las mejoras del cultivo (Pérez, 2020). Además, requiere estrategias en el manejo agronómico que aseguren una adecuada disponibilidad de nutrientes y condiciones óptimas para su desarrollo.

En la búsqueda de alternativas sostenibles para mejorar el desarrollo y rendimiento de los cultivos surge la utilización de microorganismos benéficos, también la aplicación de los mismos en el cultivo de melón. Los bioestimulantes permiten reducir el uso de fertilizantes, así como aumentar el rendimiento y la tolerancia al estrés originado por distintos factores abióticos que puedan influir en el crecimiento vegetal y la fisiología (Hidalgo, 2020).

Los bioestimulantes son sustancias o microorganismos que se aplican en las plantas para mejorar su eficacia, tanto en absorción como en la asimilación de los nutrientes, asimismo le provee de tolerancia al estrés biótico y abiótico, y puede mejorar algunas de sus características agronómicas. Estos bioestimulantes permiten incrementar el rendimiento de los cultivos mediante la

estimulación y vigorización del cultivo desde la germinación hasta la fructificación (Valverde et al., 2020). Entre los distintos tipos de bioestimulantes se encuentran los microorganismos benéficos, que además de actuar como bioestimulantes ayudan al control biológico de otros fitopatógenos.

Entre los microorganismos utilizados se encuentra el hongo *Trichoderma sp.* que tiene la capacidad de colonizar las raíces, y como respuesta a esto la planta colonizada sintetiza y acumula fitoalexinas, flavonoides, fenoles y terpenos; al mismo tiempo produce enzimas y hormonas que inducen al crecimiento de la planta, así como aumentan la eficiencia y disponibilidad de nutrientes como el fósforo (Meyer et al., 2022). *Trichoderma* es un hongo fitopatógeno que tiene la capacidad de impedir el desarrollo de hongos y/o nematodos que causan enfermedades en las plantas, mediante la competencia por los nutrientes, el hiperparasitismo o degradándolos. Como un agente de control biológico ofrece diversas ventajas como su rápido crecimiento y desarrollo, su capacidad de adaptación a diferentes sustratos y su gran tolerancia a condiciones ambientales adversas; del mismo modo actúa contra un amplio rango de hongos fitopatógenos, así como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, entre otros (Chiriboga et al., 2015).

Mientras que el *Azospirillum* que es una bacteria promotora de crecimiento la cual fija nitrógeno atmosférico, así como libera hormonas y enzimas en la rizósfera, favoreciendo el desarrollo de las raíces (Díaz et al., 2015). Estas bacterias tienen la capacidad de colonizar cientos de especies de plantas y mejorar su crecimiento, desarrollo y productividad notablemente en condiciones de campo. Además de la fijación de nitrógeno, tiene la capacidad de producir varias fitohormonas, principalmente auxinas y ácido indol-3-acético (Coniglio et al., 2019).

Por otro lado, la bacteria del género *Bacillus* induce la producción de antibióticos, promueve el crecimiento vegetal, y participa en la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos, y la producción de sustancias antagonistas a patógenos o induce mecanismos de resistencia en las plantas (Corrales et al., 2017). La bacteria *Bacillus* sp. se destaca por su capacidad para solubilizar fosfatos, contribuyendo significativamente a mejorar la disponibilidad de nutrientes en los microambientes. Esto es importante ya que el fósforo es un elemento limitado en la agricultura y es esencial para optimizar y aumentar el rendimiento de los cultivos vegetales (Corrales et al., 2014).

Bacillus aryabhattai tiene la capacidad de supresión de nematodos *Meloidogyne* en el caso de la aplicación de este

microorganismo en los surcos de plantación. Asimismo, en condiciones de estrés hídrico puede aumentar la altura y el diámetro del tallo (Ndoung; Dos Santos, 2019).

B. megaterium es una PGPB adaptable y resistente al estrés, por lo que tiene un potencial para aplicaciones en la agricultura y la biotecnología. Desempeña funciones clave en la colonización del suelo y las plantas, la promoción del crecimiento vegetal, y otras características biotecnológicas importantes, como la resistencia al estrés osmótico, térmico, oxidativo, nitrosativo, y a metales pesados (Nascimento et al., 2020).

Objetivos

- Evaluar el efecto de la aplicación de *Trichoderma* sp., *Bacillus* spp. y *Azospirillum brasilense* de forma individual y asociada en el cultivo del melón.

Específicos

- Determinar la longitud total de las ramas, la longitud de la raíz.
- Determinar la cantidad de frutos por planta y el rendimiento por hectárea.

Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Agropecuaria y Ambiental (CIAA FIA UNE). Ubicado sobre la Ruta Internacional N° 2 en el Km 26 del Distrito

de Minga Guazú. Departamento de Alto Paraná, Paraguay.

En cuanto al clima, el Alto Paraná posee un clima subtropical, con temperaturas cálidas y húmedas durante todo el año. La media de lluvia es de 1500 milímetros al año, y la temperatura anual media es de 23 °C. El clima húmedo es ideal para el crecimiento de la vegetación (Grassi, 2019). En cuanto al suelo, se caracteriza por tener su origen en rocas basálticas, con media a alta fertilidad, pH ácido, altos contenidos de Al, así como arcillas, óxidos de Fe y Al (Rojas, 2018).

En la investigación se realizó con un diseño experimental de bloques completos al azar, teniendo ocho (8) tratamientos y cuatro

repeticiones (4), totalizando treinta y dos (32) unidades experimentales, con una dimensión total de la parcela de 900 m², y cada unidad experimental de 5,6 metros de largo y 4 metros de ancho (22,4 m²) del cual la parcela útil de 6,72 m². La plantación se realizó con distancia de 1,6 m entre líneas y 0,7 m entre plantas, que corresponde una densidad de 8.928 plantas por hectáreas.

El material vegetal utilizado en el experimento es la variedad híbrida Sunrise, cuyo ciclo de cultivo es de 80 días.

Los tratamientos (Tabla 1) consistieron en la aplicación de forma individual y asociada de microorganismos benéficos de acuerdo a la dosis recomendada por el fabricante.

Tabla 1. Tratamientos utilizados en el experimento. Minga Guazú, 2024.

TRATAMIENTOS	DOSIS (mL.Ha ⁻¹)	DESCRIPCIÓN
T ₁	0	Testigo
T ₂	250	<i>Trichoderma sp.</i>
T ₃	250	<i>Azospirillum brasilense</i>
T ₄	250	<i>Bacillus spp.*</i>
T ₅	250 + 250	<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Azospirillum brasilense</i>
T ₆	250 + 250	<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Bacillus spp.*</i>
T ₇	250 + 250	<i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus spp.*</i>
T ₈	250 + 250 + 250	<i>Trichoderma sp.</i> + <i>Azospirillum brasilense</i> + <i>Bacillus spp.*</i>

* *Bacillus aryabhattai* + *Bacillus megaterium*

La siembra se realizó en macetas, utilizando una mezcla de sustrato y humus comercial, colocando una semilla por maceta. La parcela se instaló sobre

rastrajo de avena, en la cual se aplicó herbicida 30 días antes de la plantación para eliminar malezas.

La plantación se realizó una vez que las plántulas tengan 3 hojas verdaderas, realizando un hoyo de 15 cm de profundidad con una distancia entre hileras de 1,6 metros y 0,70 metro entre plantas.

La aplicación de los tratamientos se realizó en el día de la plantación, aplicando los microorganismos al atardecer, según el tratamiento en cada unidad experimental

A los 15 días después de la plantación se realizó el capado para la estimulación de la formación de ramas secundarias. La fertilización se realizó según los resultados de análisis químicos de suelo, en tres aplicaciones, la primera al momento de la plantación, la segunda al inicio de la floración, y la tercera durante el cuajado de frutos. Además, durante el ciclo del cultivo se realizó control de malezas, plagas y enfermedades según necesidad, con la aplicación de productos químicos para cada caso.

Las variables evaluadas fueron:

- **Longitud total de ramas:** se midió la longitud total de las ramas de tres (3) plantas tomadas al azar dentro de la

parcela útil de las cuales se sacaron el promedio de las mismas para cada unidad experimental.

- **Longitud de la raíz:** se midió la longitud de la raíz de tres (3) plantas tomadas al azar dentro de la parcela útil de las cuales se sacaron promedio de las mismas para cada unidad experimental.
- **Cantidad de frutos por planta:** se realizó el conteo de frutos de todas las plantas dentro de la parcela útil y de las cuales se sacaron el promedio de las mismas para cada unidad experimental.
- **Rendimiento total:** para tal efecto se tuvo en cuenta la cantidad de frutos por planta de cada unidad experimental, cuya parcela útil será de 6,72 m². Posteriormente, se llevó a Ha⁻¹.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico AgroEstat para el Análisis de Varianza y comparación de medias con test de Tukey al 5%.

Resultado y discusión

Para la variable longitud de la raíz, se encontraron diferencias altamente significativas en función a la aplicación de microorganismos benéficos de forma individual y asociada en el cultivo de melón, con un coeficiente de variación de 12,3% y un DMS de 13,2% en la comparación de

medias. Siendo el T7 estadísticamente superior al T5, T1, T4 y T2, pero estadísticamente igual al T3, T6 y T8. (Tabla 2).

Asimismo, se observa que, la combinación de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus spp.*, correspondiente al T7 obtuvo el mejor

desempeño en relación a los demás tratamientos, arrojando un promedio de 57,5 cm en la longitud de la raíz, seguido por el T3 correspondiente a la aplicación de *Azospirillum brasilense* de forma individual, con un promedio de longitud de raíz de 52,9 cm. Autores como Licea et al. (2020) indican que la bacteria *Azospirillum brasilense* mejora las características morfológicas de los vegetales, aumentando de forma significativa el crecimiento de las raíces, lo que permite una mayor absorción de agua y nutrientes, por lo que la inoculación de los cultivos con esta bacteria ejerce efectos benéficos

entre los que destacan el crecimiento vegetal y el incremento en el rendimiento del cultivo. En cuanto al *Bacillus spp.*, Rojas et al. (2013), mencionan que estas bacterias promueven el crecimiento vegetal a través de vías o mecanismos independientes de rutas que involucran auxinas o etileno, y se considera que dichas rutas son las principales para promover el desarrollo vegetal en diversas especies. La inoculación con estas bacterias puede influir en el incremento en el peso fresco y seco, la longitud del tallo y la raíz, así como el número y longitud de raíces laterales, en diversos cultivos.

Tabla 2. Comparación de medias de longitud de raíz con la aplicación de *Trichoderma sp.*, *Bacillus spp.* y *Azospirillum brasilense* de forma individual y asociada en el cultivo del melón. Minga Guazú, 2024.

Tratamiento	Longitud de la Raíz
T7	57,5 a
T3	52,9 ab
T6	48,1 abc
T8	44,5 abc
T5	41,4 bc
T1	41,4 bc
T4	40,1 bc
T2	37,8 c
CV (%)	12,3
M.G.	45,5
DMS (5%)	13,2

Como se aprecia en la Tabla 3, en lo que respecta a la longitud total de ramas, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (NS), aunque se destaca que los valores más altos se registraron con T7 (228,6 cm),

tratamiento que corresponde a la aplicación de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus spp.* mientras que, el menor valor fue observado en el T1 (195,5 cm), correspondiente al testigo.

En cuanto a la cantidad de frutos, tampoco se hallaron diferencias significativas. Sin embargo, el T7 que corresponde a la aplicación de *Azospirillum brasilense* + *Bacillus spp.* presentó los valores más altos (con 6,0 frutos respectivamente), mientras que el T8 correspondiente a la aplicación de *Trichoderma sp.* + *Azospirillum brasilense* + *Bacillus spp.* mostró el menor valor (5,1 frutos). Estos resultados sugieren que, si bien no hay efectos estadísticamente demostrables, la combinación de *A. brasilense* + *Bacillus spp.* podría estar mostrando tendencias de respuesta positiva.

Por último, el rendimiento, medido en frutos por hectárea, presentó también diferencias no significativas. No obstante, T7 volvió a destacar con el mayor valor de rendimiento (9040,1 Frutos Ha^{-1}), seguido de T6 (8705,3 Frutos Ha^{-1}) y T5 (8482,0 Frutos Ha^{-1}), lo que indica un posible efecto acumulativo o sinérgico en los tratamientos múltiples. Por el contrario, el tratamiento T4 registró el menor rendimiento (7738,0 Frutos Ha^{-1}).

Estos resultados sugieren que, si bien no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos, existen indicios de que la combinación de microorganismos podría estar promoviendo un efecto positivo en el crecimiento vegetativo y el rendimiento del cultivo de melón. Considerando que en investigaciones respecto al uso de *Bacillus spp.* en cucurbitáceas como el pepino han

arrojado resultados respecto a su influencia como organismo promotor de crecimiento, mejorando la cantidad de materia orgánica en el suelo, y presentando actividades que favorecen el crecimiento de las plantas, tales como la biosíntesis de auxinas, la producción de ureasa, la desnitrificación, la oxidación del amoníaco y la fijación de nitrógeno. Por lo que, al utilizar este microorganismo, se observó un efecto multifuncional en el desarrollo de las plantas, con un incremento del 22 al 33% en la altura de la planta, el ancho de las hojas y el grosor del tallo de los pepinos (Kim et al., 2019). En cuanto al *Azospirillum brasilense*, se ha demostrado que su inoculación en semillas de melón incrementa la velocidad de germinación, así como el aumento en la cantidad de flores femeninas y por ende en la cantidad de frutas por planta, pudiendo incrementar hasta un 30% del rendimiento ya que esta bacteria tiene una influencia en el desarrollo de las raíces, realizando cambios morfológicos y fisiológicos en el mismo, logrando una mayor absorción de agua y minerales (López, 2021).

Es posible que con un mayor número de repeticiones o bajo diferentes condiciones ambientales se puedan evidenciar efectos más marcados. Coincidiendo con estudios previos, la acción conjunta de microorganismos promotores del crecimiento vegetal puede mejorar el desarrollo radicular y la eficiencia en la

absorción de nutrientes, lo que se traduce en un mejor desempeño del cultivo

Tabla 3. Comparación de medias de longitud total de ramas, cantidad de frutos y rendimiento, con la aplicación de *Trichoderma sp.*, *Bacillus spp.* y *Azospirillum brasilense* de forma individual y asociada en el cultivo del melón. Minga Guazú, 2024.

Tratamiento	Longitud Total de Ramas (Cm) (NS)	Cantidad de Frutos (NS)	Rendimiento (Frutos Ha ⁻¹) (NS)
T1	195,5	5,9	8779,8
T2	206,7	5,6	8184,4
T3	200,8	5,6	8333,2
T4	209,8	5,2	7738,0
T5	205,4	5,7	8482,1
T6	216,7	5,8	8705,3
T7	228,6	6,0	9040,1
T8	211,2	5,1	7589,2
CV (%)	8,7	15,5	15,3
M.G.	209,3	5,6	8356,5
DMS (5%)	41,6	2,07	3051,7

Conclusión

La inoculación en el suelo con *Trichoderma sp.*, *Azospirillum brasilense* y *Bacillus spp.* de forma individual y asociada no incide en los parámetros de longitud total de ramas, cantidad de frutos y rendimiento en el cultivo del melón.

La aplicación combinada de *Azospirillum brasilense* y *Bacillus spp.* influye en la longitud de la raíz alcanzando un valor máximo de 57,5 cm.

Bibliografía

Chiriboga, H., Gómez, G. Y Garcés, K. (2015). *Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo:*

Trichoderma spp. para el control biológico de enfermedades. IICA. <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf;jsessionid=5A7AC3824CC3C1762427A0CE76F1C18E?sequence=1>

Coniglio, A.; Mora, V.; Puente, M.; Cassán, F. (2019). *Azospirillum* as Biofertilizer for Sustainable Agriculture: *Azospirillum brasilense* AZ39 as a Model of PGPR and Field Traceability. pp 45–70. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-17597-9_4

- Corrales, L.; Sánchez, L.; Arévalo, Z.; Moreno, V. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA*, vol. 12, n. 21, pp. 165-178. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n22/v12n22a06.pdf>
- Corrales, L.; Caycedo, L.; Gómez, M.; Ramos, S.; Rodríguez, J. (2017). *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA*, vol. 15, n. 27, pp. 45-65. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00046.pdf>
- Díaz, M.; Fernández, M.; Bravo, O.; Berger, A.; Satorre, E. (2015). *Field Evaluation of Extensive Crops Inoculated with Azospirillum sp.* <https://link-springer-com.ezproxy-cicco.conacyt.gov.py/content/pdf/10.1007/978-3-319-06542-7.pdf>
- Grassi, B. (2019). *Estado del clima en Paraguay 2019*. Asunción: MADES. <http://dncc.mades.gov.py/wp-content/uploads/2020/10/Estudio-del-Clima-Paraguay-2019-1.pdf>
- Hidalgo, R. (2020). *Evaluación del rendimiento del cultivo de pepino (Cucumis sativus L.) ante la aplicación de bioestimulantes a base de algas marinas en la zona de Simón Bolívar provincia del Guayas*. Tesis de Grado – Facultad de Ciencia Agropecuaria, Universidad Técnica de Babahoyo. <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/7976/TE-UTB-FACIAG-ING%20AGRON-000233.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Kim, Y., Park, Y., Lee, I. (2019). Alleviating Heat Stress of Oriental Melon (Cucumis melo var. makuwa) Through Microbe with ROS Scavenging Ability. *The Korean Society of Crop Science*, vol. 54, n. 1, pp. 126-139. DOI: 10.7745/KJSSF.2021.54.1.126
- Licea, J.; Quiroz, J.; Hernández, J. (2020). Impacto de *Azospirillum brasilense*, una rizobacteria que estimula la producción del ácido indol-3-acético como el mecanismo de mejora del crecimiento de las plantas en los cultivos agrícolas. *Revista Boliviana de Química*, vol. 37, n. 1, pp. 34-39, 2020. <https://www.redalyc.org/journal/4263/426363282005/html/>
- López, P. (2021). *Efectos de la inoculación de Azospirillum brasilense sobre la fisiología de la planta y la calidad del fruto de melón (Cucumis melo L.) variedad Honey Dew*. [Tesis de grado]. Universidad el Bosque. <https://repositorio.unbosque.edu.co>

- /server/api/core/bitstreams/5a4ac1a9-5300-4c4a-8554-1ee8a721a711/content
- Meyer, M., Mazaro, S. Y Da Silva, J. (2022). *Trichoderma: su uso en la agricultura*. Embrapa. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1146280/1/LV-Trichoderma-espanhol-2022.pdf>
- Nascimento, F.; Hernández, A.; Glick, B.; Rossi, M. (2020). Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, vol. 25. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X19305430>
- Ndoug, O.; Dos Santos, M. (2019). Potencial de *Bacillus aryabhattai* para o controle de *Meloidogyne incognita* na cultura do milho. <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/28016/1/PotencialBacillusAryabhattai.pdf>
- Pérez, R. (2020). *Desarrollo de una fertilización química para la producción de melón (Cucumis melo L.) bajo invernadero*. Tesis de Grado - Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Universidad Estatal del Sur de Manabí. 101 p. <https://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/2474/1/TESIS%20Y%20REPORTE%20URKUND%20PEREZ%20CASTILLO.pdf>
- Rojas, D.; Contreras, M.; Santoyo, G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género *Bacillus*. *Biológicas*, vol. 15, n. 2. pp. 36-41
- Rojas, P. (2018). *Relación de la acidez intercambiable con algunos parámetros químicos y físicos en suelos en diferentes usos*. <http://repositorio.une.edu.py/handle/123456789/517>
- Valverde, L., Moreno, J., Quijije, K., Castro, A., Merchán, W. Y Gabriel, J. (2020). Los bioestimulantes: Una innovación en la agricultura para el cultivo del café (*Coffea arabica* L.). *Journal of the Selva Andina Research Society*, vol. 11, n. 1, pp. 18-28. http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v11n1/v11n1_a03.pdf

39. Salud Humana

Evaluación del uso de metformina sobre la unidad fetoplacentaria en un modelo murino de hipercolesterolemia materna

Autor: Morello, Camila, camila.morello@estudiantes.uv.cl;

Órdenes, Yasmín, yasmín.ordenes@estudiantes.uv.cl; Reyes, Maylin

maylin.reyes@estudiantes.uv.cl

Co-autor(es): Andaur, Sofía; Benavides, Pamela; Díaz, Rienzi; Espinoza, Mario; Órdenes, Vannia.

Orientador/a: Sáez, Tamara; Zamorano, Danilo.

Universidad de Valparaíso, Facultad de Medicina, Escuela de Obstetricia y Puericultura

Abstract

La metformina se ha propuesto como intervención terapéutica para la disfunción vascular materna en patologías gestacionales; sin embargo, su seguridad fetal sigue siendo controversial. En este estudio se evaluó su efecto en desenlaces fetoplacentarios de ratonas gestantes sanas y en un modelo murino de disfunción vascular materna inducida por dieta alta en colesterol (HCD). Ratonas C57BL/6 recibieron dieta control (CD) o HCD, tratado con o sin metformina (5 mg/ml) en agua, entre los días gestacionales (GD) 13,5 y 18,5 (4 grupos, n=3-8). Se registraron peso corporal, consumo de alimento y agua. En el GD18,5, las hembras fueron eutanasiadas y se obtuvieron datos morfométricos de fetos y placentas. Los datos (media $\pm$ DE) se analizaron mediante two-way ANOVA con post hoc de Sidak. Diferencias significativas si $p \leq 0,05$. Bioética BEA018-2024. No se observaron cambios en el consumo de alimento ni agua entre los grupos. La HCD redujo la ganancia de peso materno (9 ± 1 vs. $3,7 \pm 2,1$ g; $p < 0,05$), el número de crías ($7 \pm 1,7$ vs. $9,7 \pm 0,6$; $p = 0,03$) y el peso fetal ($0,9 \pm 0,1$ vs. $1,2 \pm 0,07$ g; $p < 0,0001$) en comparación con el grupo control; efectos que se acentuaron con metformina ($p = 0,04$), aunque sin cambios en el peso placentario. La combinación de HCD y metformina aumentó el número de reabsorciones fetales ($1,3 \pm 0,6$ vs. $0,3 \pm 0,6$; $p = 0,03$) y redujo el diámetro cefálico fetal ($2,2 \pm 0,1$ vs. $1,8 \pm 0,07$ mm; $p = 0,01$) versus sólo HCD. Los resultados sugieren que metformina podría ejercer efectos adversos sobre el desarrollo fetal en trastornos gestacionales asociados a disfunción vascular materna. Estos hallazgos subrayan la importancia de evaluar cuidadosamente la dosis de metformina, particularmente en condiciones de hipercolesterolemia materna suprafisiológica.

Palabras clave: Hipercolesterolemia materna, metformina, desarrollo fetal, disfunción vascular

La gestación es un periodo del ciclo vital de la mujer donde se suscitan diversos cambios adaptativos que contemplan desde la esfera psicoemocional, a modificaciones en los sistemas corporales con el fin de llevar el proceso reproductivo a término. Dentro de las adaptaciones cardiovasculares, destacan el aumento de la volemia y aumento del gasto cardíaco; y, por el lado metabólico ocurre un estado de resistencia a la insulina producto del efecto de las hormonas gestacionales (Hall, George & Granger, 2011). No obstante, la mala adaptación del cuerpo materno frente a estos cambios lleva al desarrollo de patologías del embarazo como preeclampsia y diabetes gestacional, las cuales afectan tanto el desarrollo fetal como la salud materno fetal a largo plazo (Sheiner, 2020), principalmente por el impacto negativo que tienen sobre la vasculatura materna y fetal. Es por ello que existe la necesidad de encontrar o desarrollar estrategias terapéuticas para proteger la salud cardiovascular de ambos individuos.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la principal causa de muerte en Chile y el mundo (Instituto Nacional de Estadísticas, 2016), y factores de género, como las condiciones metabólicas y hormonales –en particular las complicaciones del embarazo– contribuyen

a esta diferencia (Maas & Appelman, 2010). La dislipidemia se define como desequilibrio en el perfil lipídico e incluye la hipercolesterolemia, siendo esta última caracterizada por el aumento del colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL), conocido como colesterol “malo” por sus propiedades aterogénicas y, a menudo, acompañado por la disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), comúnmente conocido como colesterol “bueno” (Pappan, Awosika & Rehman, 2024). Su asociación con patologías gestacionales como preeclampsia y diabetes gestacional puede agravar el pronóstico, aumentando el riesgo cardiovascular sobre la salud futura de la madre y el feto en gestación (Contreras- Duarte et al., 2019).

Colesterol y dislipidemia gestacional

Durante una gestación fisiológica, existen cambios en el metabolismo lipídico materno, con aumento en los niveles séricos de triglicéridos, ácidos grasos y colesterol, necesarios para la síntesis hormonal y el desarrollo fetal. Por ejemplo, el colesterol LDL es el principal sustrato para la síntesis de progesterona placentaria mientras que los estrógenos, elevan los niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos. Este aumento de lípidos maternos es responsable del 20% del colesterol fetal (Jayalekshmi & Ramachandran, 2021), y refleja la

relación directa entre los niveles maternos y fetales. No obstante, la dislipidemia gestacional se asocia a diabetes gestacional, preeclampsia, parto prematuro (Bartels & O'Donoghue, 2011)

y mayor susceptibilidad al estrés oxidativo, debido a que causa un desbalance del perfil oxidante/antioxidante en la madre y la placenta, lo que posiblemente signifique la susceptibilidad al estrés oxidativo durante el periodo de desarrollo fetal (Mauri, Calmarza & Ibarretxe, 2021). La placenta, como órgano de conexión materno-fetal, transporta moléculas de colesterol maternas hacia el feto; sin embargo, su excesivo transporte podría provocar alteraciones epigenéticas (Bartels & O'Donoghue, 2011). También, la placenta sufre una disfunción endotelial acompañada de desbalance de moléculas vasoactivas y un deficiente mecanismo antioxidante para eliminar las ROS (Jayalekshmi & Ramachandran, 2021). Dado que los niveles de colesterol no se miden de forma rutinaria en la gestación, aún no se esclarece si la dislipidemia pudiese ser un determinante en el riesgo a largo plazo de ECV en mujeres con patologías gestacionales y su descendencia.

Con estos antecedentes, se hace menester aumentar la investigación acerca de las consecuencias de las dislipidemias durante

la gestación, para resguardar la salud maternofetal. Como se mencionó anteriormente, el colesterol es necesario para el correcto desarrollo fetal; por lo que, el uso de hipocolesterolémicos está prohibido en el embarazo, lo que conlleva a la búsqueda de alternativas seguras para proteger la salud cardiovascular sin afectar el correcto desarrollo fetoplacentario. Y dentro de estas alternativas, la metformina aparece como una potencial estrategia terapéutica.

Potencial rol cardioprotector de metformina en dislipidemias

La metformina es un fármaco normoglucemiante y de primera línea en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) por su administración sencilla, bajo costo, efectos adversos leves y mínima ganancia de peso (Verma & Mehendale, 2022). Sin embargo, la metformina tiene una diversidad de efectos pleiotrópicos en varios sistemas, órganos y procesos. Su acción principal consiste en activar la AMPK (proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina), reduciendo la producción hepática de glucosa y mejorando la sensibilidad a la insulina, lo que favorece el control glucémico. Además, disminuye productos finales de la glicación avanzada, especies reactivas de oxígeno y regula el metabolismo de la glucosa y lípidos en cardiomiocitos, minimizando el riesgo cardiovascular

(Dutta et al., 2023). Por otro lado, mejora los niveles de colesterol total y triglicéridos, lo que la posiciona como adyuvante en el tratamiento de hipercolesterolemia. Así, la metformina, indirectamente, es capaz de favorecer el tratamiento para la hipercolesterolemia. En el ámbito cardiovascular, el tratamiento con metformina en pacientes con diabetes podría reducir el área de infarto de miocardio, la mortalidad en enfermedad coronaria y mejorar la función endotelial en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (Han et al., 2019). Estos antecedentes llevaron a que la Asociación Estadounidense del Corazón (AHA) destaque la importancia de prevenir la ECV en mujeres con complicaciones del embarazo como la preeclampsia asociada a hipercolesterolemia (o dislipidemia). (Parikh et al., 2021)

Metformina y salud cardiovascular materna en el embarazo

El uso de metformina como tratamiento para dislipidemias en la gestación no ha sido estudiado a la fecha; no obstante, evidencia en patologías gestacionales sugiere efectos beneficiosos en la salud materna y fetal. En modelos in vivo y ex vivo de preeclampsia expuestos a metformina, mejora la función endotelial y ayuda a reducir el riesgo ECV en mujeres con y sin diabetes (Luo et al., 2019). En mujeres con diabetes gestacional, la

metformina redujo ligeramente el colesterol total en no obesas y de forma más significativa en mujeres obesas con la misma patología, lo que sugiere que su efecto sobre los niveles lipídicos en las gestaciones con diabetes gestacional depende del peso materno (Mauri Calmara & Ibarretxe, 2021). No obstante, dado que la dislipidemia gestacional puede presentarse sin obesidad, su impacto sobre el perfil lipídico en este escenario sería limitado.

Sin embargo, en condiciones no diabéticas su uso debe ser cauteloso y por un periodo más corto, ya que tratamientos prolongados (600 días), mejoró el estrés oxidativo, pero redujo la esperanza de vida en ratones hembra no embarazadas (y no diabéticas). Además, debido a su amplia gama de usos y su supuesto papel cardioprotector en la gestación, surgen las interrogantes, ¿su uso es seguro durante la gestación? ¿Cuáles son los efectos de la metformina en la gestantes y nivel placentario?

En un modelo murino de hipercolesterolemia materna, hembras preñadas fueron sometidas a una dieta alta en colesterol, lo que provocó disfunción vascular materna y pobres resultados gestacionales (Sáez et al., 2020), lo que sugiere que el uso de metformina en este modelo podría ser una excelente

alternativa para probar el efecto del tratamiento con metformina en la salud cardiovascular materna, pero, en primera instancia, poder determinar su efecto sobre los resultados del embarazo en dislipidemias gestacionales.

Relevancia y propósito del estudio experimental.

En la actualidad el uso de metformina en el embarazo y sus consecuentes efectos en la unidad fetoplacentaria aún genera controversia. Esto radica en que, durante períodos gestacionales en los cuales se administró metformina, alcanzó concentraciones fetales más altas que las maternas, concentrándose hasta 1000 veces en las mitocondrias fetales y placentarias. Por lo tanto, ¿qué efectos concretos a corto y largo plazo podría generar el traspaso placentario hacia el feto? ¿Son reversibles o tratables? ¿los beneficios realmente superan a los riesgos?. Esto plantea dudas sobre sus efectos reales, dado que la evidencia disponible es limitada y sugiere tanto variaciones en el crecimiento fetal en el corto plazo, como en obesidad infantil a largo plazo. (Barbour, 2022)

Dado que la metformina ha sido propuesta como un fármaco que podría proteger la salud cardiovascular frente a patologías gestacionales asociadas con dislipidemia (o hipercolesterolemia) surge la pregunta de investigación **¿la exposición a**

metformina en modelo murino con hipercolesterolemia durante su período de gestación impacta sobre la unidad fetoplacentaria en base a los indicadores de productividad gestacional?

El propósito de este estudio es contribuir con evidencia científica sobre el tratamiento con metformina en el embarazo en condiciones no diabéticas, especialmente en condiciones de hipercolesterolemia. En razón de lo anterior, esto permitirá entregar información pertinente en consejería previa a la prescripción de este medicamento de amplio consumo en estos casos, considerando que estas patologías aumentan cada vez más su incidencia en la población; entregando así, una atención más personalizada frente a alteraciones metabólicas derivadas que pueden no sólo tener consecuencias en el feto, sino que también en la salud de la mujer a largo plazo.

Objetivo General

Evaluar el efecto del uso gestacional de metformina sobre el desarrollo de la unidad fetoplacentaria en un modelo murino de hipercolesterolemia materna.

Objetivos Específicos

1. Analizar los indicadores de productividad gestacional, incluyendo el número y peso de fetos y placentas, en un modelo

murino de hipercolesterolemia materna tratado con o sin metformina, en relación con los respectivos grupos controles.

2. Comparar los indicadores de productividad gestacional, incluyendo el número y peso de fetos y placentas, en un modelo murino de hipercolesterolemia materna tratado con o sin metformina, en relación con los respectivos grupos controles.

Modelo animal y diseño experimental

Un grupo de ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad se alojaron bajo un ciclo estándar de día: noche (10:14 hrs) y tuvieron acceso a voluntad a agua y comida. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad de Valparaíso, siendo transportados desde el bioterio ubicado en Playa Ancha hacia mantenidos en la unidad de mantención animal de la Facultad de Medicina en las dependencias del edificio Bruno Günther hasta el sacrificio animal. La presencia de un tapón vaginal se consignó como el día gestacional 0.5. Al día 13.5, las hembras preñadas se asignaron de manera aleatoria a dos grupos; uno se alimentó con una dieta alta en colesterol (HCD), mientras que el segundo grupo siguió una dieta de

control (CD) hasta el día 18.5 de gestación. La HCD consistió en LabDiet®5001 con 2% de colesterol y 0.5% de ácido cólico (ácido biliar añadido con el fin de disminuir el clearance hepático de colesterol). Además, de forma aleatoria se selecciona la mitad del grupo, tanto de ratones alimentados con HCD como los CD, para administrarles dosis de metformina disuelta en agua (5 mg/ml). Esto da como resultado cuatro grupos experimentales: hembras preñadas alimentadas con CD y sin uso de metformina, hembras preñadas alimentadas con CD con uso de metformina, hembras preñadas alimentadas con HCD sin uso de metformina, y hembras preñadas alimentadas con HCD con uso de metformina (n=7 por grupo; es decir, N=28). Se registró la ingesta de alimentos y de agua de todos los grupos. Las gestantes fueron mantenidas en la unidad de mantenimiento animal hasta el día 18.5 (un día antes del término de la gestación).

Recolección de datos gestacionales

Al día 18.5 de gestación, a portas del final del proceso reproductivo, la totalidad de ratones fueron transportados al Laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Escuela de Medicina de la Facultad de Medicina de nuestra universidad, donde los animales fueron sacrificados por exanguinotransfusión de (punción y extracción cardíaca) bajo

anestesia con isoflurano inhalado (2 - 2.5%). Se obtuvo una muestra de sangre para la evaluación de los niveles de colesterol, y se registraron los parámetros de productividad gestacional tales como peso fetal y placentario, razón peso fetoplacentaria, morfología de la placenta, tamaño de la camada, morfometría fetal (medición cráneo-caudal, circunferencia cabeza) y peso materno. Una placenta y un feto por grupo fue almacenado con OCT (Optimal Cutting Temperature compound) para su criopreservación a -80°C , mientras que otras réplicas fueron fijadas con paraformaldehído al 4% para su procesamiento e inclusión en parafina para posteriores análisis.

Análisis estadístico

La distribución de los datos se evaluó mediante el test Shapiro-Wilk, y la comparación entre dos grupos se realizó mediante la prueba t de Student. Las diferencias entre más de dos grupos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (two-way ANOVA), seguido por un análisis post-hoc correspondiente (Sidak). Los datos fueron analizados y graficados mediante GraphPad Prism 10.0, y las diferencias se consideraron significativas si $p \leq 0.05$ (utilizando un error de tipo I de 0.05 y una potencia del 80%).

Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo bajo la aprobación bioética del CICUAL de la Facultad de Medicina de nuestra universidad (BEA018-2024).

Resultados:

Peso materno al día gestacional 13.5 y 18.5

Para determinar la ganancia de peso durante la gestación, se registró el peso de las ratonas preñadas el día 13.5, los cuatros grupos experimentales iniciaron con pesos similares. (Fig. 1A; $p=0.9828$ y $p=0.8697$).

Al día gestacional 18.5, un día previo al parto y antes del sacrificio, se registraron los pesos y el análisis demostró diferencia estadísticamente significativa al comparar entre los grupos tratados con dieta alta en colesterol en presencia y ausencia de metformina. (Fig. 1B; $p=0.9995$ y $p=0.1129$).

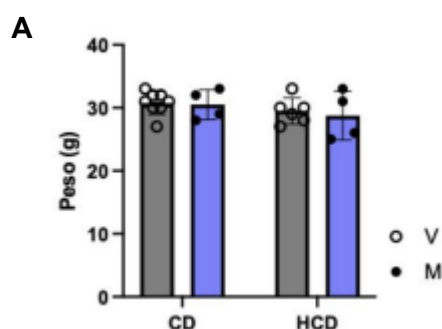


Figura 1A *Peso Materno al día gestacional 13.5*

Peso corporal en gramos de las ratonas preñadas al día gestacional 13.5. Ratones expuestos dieta control (CD) o alta en

colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estandar. CD+V, $n=8$; CD+M, $n=6$; HCD+V, $n=4$; HCD+M, $n=4$).

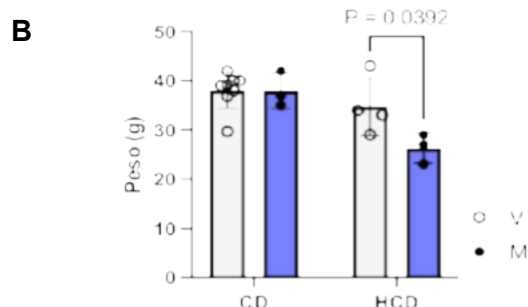


Figura 1B Peso Materno al día gestacional 18.5

Peso corporal en gramos de las ratonas preñadas al día gestacional 18.5. Ratones expuestos dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estandar. CD+V, $n=8$; CD+M, $n=3$; HCD+V, $n=4$; HCD+M, $n=3$)

Diferencia de ganancia de peso materno

En base a los datos expuestos anteriormente, se calculó la diferencia de

ganancia de pesos en el último tercio de la gestación. La dieta alta en colesterol sumado a la administración de metformina causó disminución de peso de las hembras al compararse con las hembras del mismo grupo sin metformina (5mg/mL). (Fig. 2; $p=0.0419$)

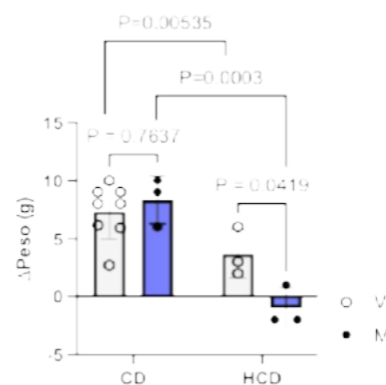


Figura 2. Diferencia de ganancia de peso materno

Gráfico del delta de peso corporal en gramos de las ratonas preñadas calculado como la diferencia de peso entre el día

18.5 y 13.5. Ratones expuestos dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). (A) Análisis de diferencias de peso corporal respecto al tratamiento y dieta. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estandar. CD+V, $n=8$; CD+M, $n=3$; HCD+V, $n=3$; HCD+M, $n=3$)

Consumo de agua y comida

Ambos consumos fueron medidos el día 13.5 y el día 18.5, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. La ingesta de metformina (5 mg/mL) en el agua a beber, no varió según dieta control o alta en colesterol (Fig. 3A $p=0.5423$ y $p=0.994$). Del mismo modo, el consumo de alimento fue similar entre ambas dietas y no varió frente al tratamiento de metformina (Fig. 3B $p=0.5218$ y $p=0.9353$).

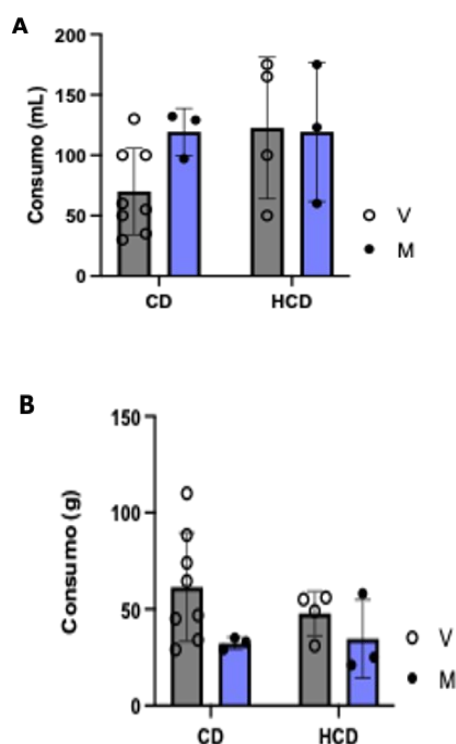


Figura 3. Consumo de agua y comida

Gráficos de consumo de agua y comida de las ratonas preñadas entre los días 13.5 y 18.5. Ratones expuestos dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). (A) Gráfico de consumo

de agua con y sin metformina (5 mg/mL) disuelta en ella. (B) Gráfico de consumo de comida). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estandar. CD+V, $n=8$; CD+M, $n=3$; HCD+V, $n=4$; HCD+M, $n=3$

Tamaño de la camada

Con el fin de evaluar el efecto de la metformina sobre los resultados del embarazo, se analizaron parámetros fetales y placentarios. Respecto al primer resultado final del embarazo, el tamaño de las camadas no varió al compararse los grupos con dieta control y alta en colesterol sin metformina (Fig 4; $p=0.9190$ y $p=0.2923$, respectivamente). Tampoco se observó una variación en el número de crías al comparar entre los grupos expuestos a la misma dieta y tratados con o sin metformina ($p=0.9151$ en dieta control y $P=0.2656$ en dieta alta en colesterol) (Fig 4).

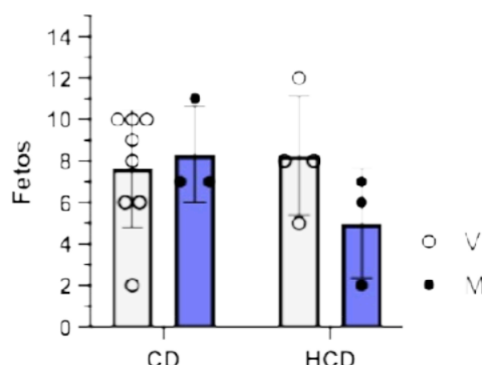


Figura 4. Tamaño de camada

Gráficos de tamaño de la camada como resultado final del embarazo. Ratones expuestos a dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estándar. CD+V, $n=8$; CD+M, $n=3$; HCD+V, $n=4$; HCD+M, $n=3$

Peso fetal

Se evaluó el peso de cada feto de las camadas de ratonas en los diferentes grupos de estudios. La dieta alta en colesterol disminuyó el peso de los fetos en comparación de la dieta control ($p < 0.0001$). Esta diferencia también se observó al comparar entre los grupos tratados con metformina ($p = 0.0003$). No hubo diferencias significativas al comparar el efecto del tratamiento de metformina (5 mg/mL) sobre el peso de los fetos en ambos grupos ($p = 0.4404$, $p = 0.9815$)

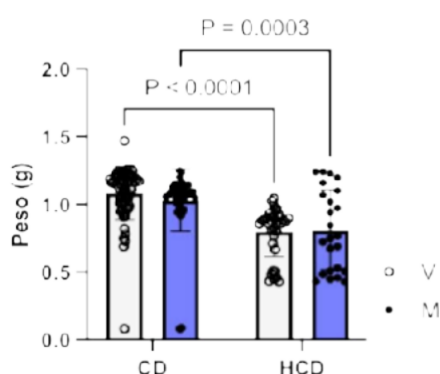


Figura 5. Peso Fetal

Gráficos de peso fetal Ratones expuestos

a dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $P \leq 0.05$. Se expresa como Media

$\pm$ Desviación estándar. CD+V, $n=61$; CD+M, $n=41$; HCD+V, $n=35$; HCD+M, $n=24$

Reabsorciones fetales

Solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo con dieta alta en colesterol tratado con metformina (5 m/mL), mostrando diferencias al compararlo con el mismo grupo sin tratamiento (Fig. 6; $p = 0.0070$) como en comparación con el grupo tratado con metformina bajo dieta control (Fig. 6, $p = 0.025$).

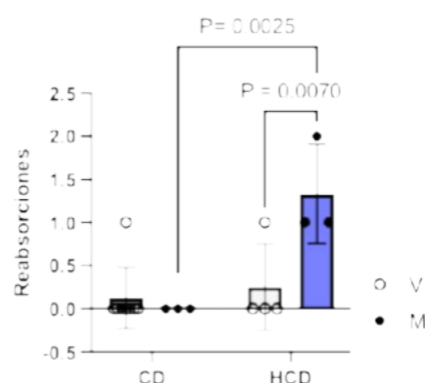


Figura 6. Reabsorciones fetales

Gráficos de reabsorciones fetales. Ratones expuestos a dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estandar. CD+V, $n=8$; CD+M, $n=3$; HCD+V, $n=4$; HCD+M, $n=3$)

Diámetro cefálico

Se evaluó el diámetro cefálico de cada feto de las camadas de ratonas en los diferentes grupos de estudio. En condiciones de dieta control tratados con metformina, se demostró un incremento de manera significativa en el diámetro cefálico a diferencia del grupo vehículo ($p=0.0114$). A comparación, el grupo con dieta alta en colesterol presentó una reducción marcada del diámetro respecto a la dieta control, siendo una mayor diferencia significativa para el grupo tratado con metformina, mostrando un diámetro cefálico significativamente menor en comparación del grupo vehículo ($p=0.0355$).

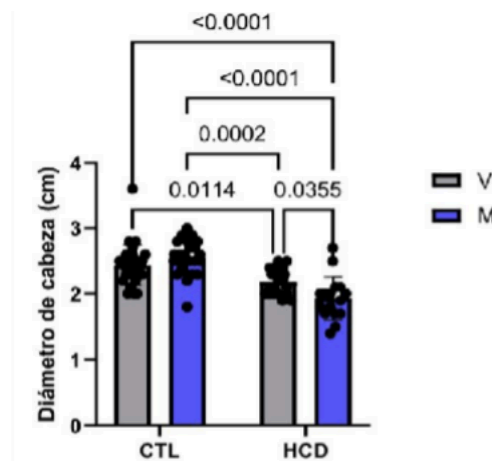


Figura 7. Diámetro cefálico.

Gráfico de diámetro cefálico. Ratones expuestos a dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estándar. CD+V, $n=3$, CD+M, $n=3$, HCD+V, $n=3$, HCD+M, $n=3$

Peso placentas

Respecto al peso de las placentas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudios, solo una tendencia a la disminución de su peso al adicionar metformina respecto a la dieta control, y una tendencia al aumento del peso con tratamiento de metformina en el grupo alimentado con una dieta alta en colesterol (Fig. 8)

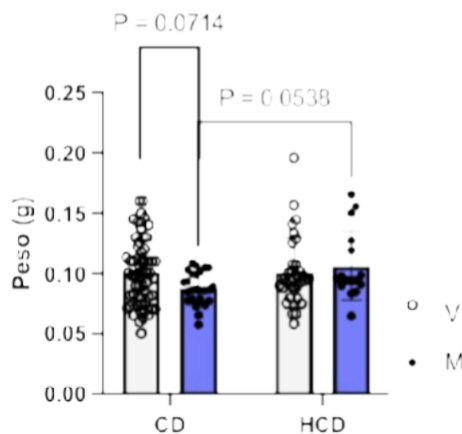


Figura 8. Peso Placentas

Gráficos de peso placentario. Ratones expuestos a dieta control (CD) o alta en colesterol (HCD) tratadas con vehículo (V, barras grises) o metformina (M, barras azules). El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías, seguido de post-hoc Sidak. La significancia estadística está dada por $p \leq 0.05$. Se expresa como Media $\pm$ Desviación estándar. CD+V, $n=61$; CD+M, $n=41$; HCD+V, $n=35$; HCD+M, $n=24$)

Discusión

La metformina es un normoglicemiante ampliamente utilizado y reconocido por sus efectos beneficiosos en el manejo de patologías metabólicas; sin embargo, hemos comprobado que existe un desgaste significativo en la unidad fetoplacentaria alterando los parámetros morfológicos del feto causando modificaciones en las vellosidades placentarias y con ello el intercambio de nutrientes con el feto por medio de la placenta. Diversos estudios han descrito

su capacidad para mejorar la sensibilidad a la insulina, reducir estrés oxidativo y protección sobre la vasculatura (Luo et al., 2019). Incluso, en la gestación se ha propuesto que su uso se asocia a menor riesgo de preeclampsia, cesárea y de parto prematuro. Estos antecedentes han propuesto a la metformina como una alternativa terapéutica y segura. Sin embargo, los resultados del presente estudio sugieren que los efectos de la metformina dependen estrechamente del contexto metabólico en el que se administra. En modelo murino, la hipercolesterolemia materna asociada a tratamiento con metformina (5 mg/mL) produjo efectos adversos sobre la productividad gestacional, a comparación de aquellos grupos quienes fueron tratados con tal solo una dieta control o sin metformina.

El impacto sobre los parámetros fetoplacentarios de la metformina asociada a una dieta alta en colesterol radica en un aumento significativo de reabsorciones fetales, lo que contrasta con su supuesto rol vaso protector señalado anteriormente (Dutta et al., 2023). Este hallazgo podría explicarse por la acumulación del fármaco en las mitocondrias placentarias y fetales, que en un ambiente con alto estrés por exceso de colesterol favorecería a procesos de apoptosis y alteraciones en la diferenciación celular. Adicionalmente se

evidenció que la metformina no fue capaz de revertir la disminución del peso fetal inducida por la dieta alta en colesterol. Por el contrario, en este grupo también se observó una reducción significativa del diámetro cefálico, lo que indica un posible compromiso del crecimiento cefálico fetal. Además, bajo condiciones fisiológicas (grupo control), si bien se observó un aumento del diámetro cefálico con metformina, este efecto “positivo” debe interpretarse con cautela, ya que la literatura describe que la exposición prenatal al fármaco puede asociarse a alteraciones en la programación del crecimiento y a un mayor riesgo de disfunciones metabólicas a largo plazo (Barbour, 2022). Estos resultados sugieren que, lejos de proteger al feto frente a la dislipidemia materna, la metformina podría agravar los efectos deletéreos del exceso de colesterol en el desarrollo fetal.

Consideramos como efecto beneficioso a la menor ganancia de peso materno en gestantes con sobrepeso, obesidad o resistencia a la insulina, sin embargo, en un embarazo en condiciones de dislipidemia, la menor ganancia de peso representa un riesgo al disminuir la disponibilidad energética para el desarrollo fetal. El grupo de estudio con dieta alta en colesterol con metformina presentó menor ganancia de peso materno al final del proceso reproductivo, lo que podría estar

vinculado con la activación de la proteína GDF-15, la cual, disminuye el apetito y reduce la ingesta calórica (Day et al., 2019). Sin embargo, este efecto podría transformarse en un factor adverso, la gestación exige un aumento de la ingesta energética para sostener los procesos de crecimiento y desarrollo uterofetoplacentario, una reducción en la ganancia ponderal materna, podría limitar la disponibilidad energética y metabólica, traducándose en menor reservas maternas y potencial restricción de nutrientes hacia el feto.

En conjunto, los resultados de este estudio cuestionan el uso de la metformina asociadas a hipercolesterolemia gestacional. Si bien, es un fármaco con beneficios probados en otros escenarios, en este estudio experimental se asoció a efectos negativos relevantes como los anteriormente mencionados. Esto evidencia que los efectos positivos descritos en la literatura no son extrapolables a todas las condiciones metabólicas y que la metformina en conjunto con una dieta alta en colesterol conlleva riesgos considerables para la unidad fetoplacentaria.

Por lo tanto, se hace necesario replantear la dosis del tratamiento con metformina en embarazos con dislipidemia, o bien su rol como tratamiento en estas circunstancias,

investigando en mayor profundidad los mecanismos que median estos efectos adversos y evaluando con cautela su prescripción en este grupo de riesgo.

Conclusión:

El presente estudio demostró que la metformina ejerce efectos diferentes según contexto nutricional en la gestación asociado a niveles de colesterol supra fisiológicos. Cumpliendo los objetivos de evaluar el efecto del uso gestacional de este fármaco sobre la unidad fetoplacentaria, medida en base a parámetros como los mencionados en el punto anterior.

En base a ello, se logró comparar parámetros morfométricos fetoplacentarios, en adhesión a análisis de indicadores de productividad gestacional.

Dentro de los principales hallazgos, observamos que en condiciones normales de dieta control se asocia a un crecimiento mayor relacionado a diámetro cefálico aumentado, sugiriendo que el metabolismo materno en adhesión al consumo de metformina frente a condiciones de dieta hipercolesterolémica influye decisivamente en los resultados fetales ocasionando un déficit en el desarrollo de estructuras especialmente en incremento de peso ponderal y/o crecimiento intrauterino; pesquizando en otros resultados una

disminución en el peso fetal en este último grupo. En adhesión; es fundamental considerar un aumento de reabsorciones fetales en hipercolesterolemia gestacional asociada a metformina, lo que podría estudiarse en futuras investigaciones a mayor profundidad para evaluar el riesgo de pérdida en el uso de este fármaco con condiciones altas en colesterol durante la gestación.

El presente estudio sustenta una amplia gama de posibilidades para futuras investigaciones, debido a que continúa siendo una problemática de escaso marco teórico, debido a que no muchos estudios se han centrado en la hipercolesterolemia, al ser pesquisada como un hallazgo ampliamente normalizado durante la gestación, en adhesión al consumo de metformina que actualmente mantiene su uso en diversidad de alteraciones metabólicas, siendo una valiosa fuente de información para considerar este factor de riesgo comprobado sobre el feto y resguardar el manejo de gestaciones de riesgos prevenibles.

Referencias Bibliográficas:

Barbour, L. (2022). Controversias en el uso de metformina en el embarazo y el papel de los triglicéridos en el sobrecrecimiento fetal. *Sociedad Argentina de Diabetes*, 56(3), 120–125.

Bartels, Ä., & O'Donoghue, K. (2011). Cholesterol in pregnancy: A review of knowns and unknowns. *Obstetric Medicine*, 4(4), 147–151.

Contreras-Duarte, S., Fuenzalida, B., Sandoval, D., Carvajal, C., & Sobrevia, L. (2019). Maternal dyslipidaemia in pregnancy with gestational diabetes mellitus: Possible impact on foetoplacental vascular function and lipoproteins in the neonatal circulation. *Current Vascular Pharmacology*, 17(1), 52–71.

Day, E. A., Ford, R. J., Smith, B. K., Mohammadi-Shemirani, P., Morrow, M. R., Gutgesell, R. M., ... Steinberg, G. R. (2019). Metformin-induced increases in GDF15 are important for suppressing appetite and promoting weight loss. *Nature Metabolism*, 1(12), 1202–1208.

Dutta, S., Shah, R. B., Singhal, S., Bansal, S., Sinha, S., Haque, M., et al. (2023). Metformin: A review of potential mechanism and therapeutic utility beyond diabetes. *Drug Design, Development and Therapy*, 17, 1907–1932.

Hall, M. E., George, E. M., & Granger, J. P. (2011). El corazón durante el embarazo. *Revista Española de Cardiología*, 64(11), 1045–1050.

Han, Y., Xie, H., Liu, Y., Gao, P., Yang, X., Shen, Z., ... Xu, H. (2019). Effect of metformin on all-cause and cardiovascular

mortality in patients with coronary artery diseases: A systematic review and an updated meta-analysis. *Cardiovascular Diabetology*, 18, 96.

Instituto Nacional de Estadísticas. (2016). *Estadísticas vitales: Informe anual 2016. Tabla 9. Número y porcentaje de defunciones, por sexo, según capítulos de causa de muerte, CIE-10, 2016*. Santiago, Chile: INE.

Jayalekshmi, V. S., & Ramachandran, S. (2020). Maternal cholesterol levels during gestation: Boon or bane for the offspring? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 468(1), 45–52.

Jayalekshmi, V. S., & Ramachandran, S. (2021). Maternal cholesterol levels during gestation: Boon or bane for the offspring? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(1), 401–416.

Luo, F., Das, A., Chen, J., Wu, P., Li, X., & Fang, Z. (2019). Metformin in patients with and without diabetes: A paradigm shift in cardiovascular disease management. *Cardiovascular Diabetology*, 18(1), 54.

Maas, A., Appelman, Y. E. A., & van der Schouw, Y. T. (2010). Gender differences in coronary heart disease. *Netherlands Heart Journal*, 18(12), 598–602.

Mauri, M., Calmarza, P., & Ibarretxe, D. (2021). Dyslipemias and pregnancy: An

update. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 33(1), 41–52.

Pappan, N., & Rehman, A. (2024). Dyslipidemia. In *StatPearls*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing.

Parikh, N. I., Gonzalez, J. M., Anderson, C. A. M., Judd, S. E., Rexrode, K. M., Hlatky, M. A., ... Haan, M. N. (2021). Adverse pregnancy outcomes and cardiovascular disease risk: Unique opportunities for cardiovascular disease prevention in women: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 143(18), e902–e916.

Sáez, T., Spaans, F., Kirschenman, R., Sawamura, T., & Davidge, S. T. (2020).

High-cholesterol diet during pregnancy induces maternal vascular dysfunction in mice: Potential role for oxidized LDL-induced LOX-1 and AT1 receptor activation. *Clinical Science*, 134(17), 2295–2313.

Sheiner, E. (2020). Gestational diabetes mellitus: Long-term consequences for the mother and child. *Frontiers in Clinical Diabetes and Healthcare*, 1, 1–5.

Verma, V., & Mehendale, A. M. (2022). A review on the use of metformin in pregnancy and its associated fetal outcomes. *Cureus*, 14(10), e30094.

39 - Ciencias de la Vida – Salud Humana

Determinación del PH y potencial erosivo de bebidas energizantes en la Ciudad de Concepción-Paraguay

Autor: Cabral Martínez Julio Cesar; mj4759348@gmail.com

Co-autor(es): Ferreira Gamarra, Milagros

Orientador: Ramos Arrúa, Rocío Marlene; ramosrociomarlenes@gmail.com

Universidad Nacional de Concepción – Facultad de Odontología- Paraguay

RESUMEN

Estas bebidas, formuladas con cafeína, azúcares, y ácidos como el cítrico y fosfórico, difundida entre adolescentes y adultos jóvenes, presentan un pH bajo, lo cual favorecen procesos de desmineralización del esmalte dental. El objetivo de este estudio descriptivo fue determinar el pH de las bebidas energizantes y correlacionarlo con el potencial erosivo sobre los dientes. Se seleccionaron 4 diferentes bebidas energéticas disponibles comercialmente en la ciudad de Concepción, adquiriéndose 1 lata de cada una seleccionadas al azar, se formaron 4 grupos experimentales de 4 bebidas cada una, separados arbitrariamente por marca comercial: Grupo A: Baly; Grupo B: Dark Dog; Grupo C: Monster; Grupo D: Red Bull, los datos fueron obtenidos y registrados por un solo examinador calibrado, para la medición de pH se obtuvieron 16 muestras de 40ml para cada grupo, ocho de ellas se midieron a 17°C y las otras ocho a 4°C en cada tipo de bebida, ya que son las temperaturas habituales de ingesta, para lo cual las muestras fueron almacenadas a las temperaturas mencionadas. el pH fue medido usando un pHmetro digital calibrado microprocessor pH meter AOKTON, pH/lon 510, para cada grupo se obtuvieron los pH según temperatura y los datos fueron vaciados en una planilla Excel, todas las bebidas de la muestra presentaron $\text{pH} < 5.5$ considerado como crítico con un rango entre 2.8 - 3.4 a 4°C y 3,2-5,3 17°C, el menor fue DARK DOG a 4°C ($\text{pH}=2.8$) y el mayor BALY a 17°C ($\text{pH}=5,3$), la desviación estándar alta se observa con BALY (5,3-3,1) indica que el pH cambia mucho con la temperatura, las bebidas estudiadas presentaron pH ácido, haciendo de ellas bebidas potencialmente erosivas para los dientes, los valores de pH fueron menores a 4°C que los medidos a 17°C, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

Palabras clave: erosión dental, pH, bebidas energizantes.

INTRODUCCIÓN

El consumo de bebidas energizantes ha aumentado de manera significativa, especialmente entre adolescentes y adultos jóvenes, debido a sus efectos estimulantes y su amplia disponibilidad en el mercado como lo refiere Poggi M.A et al (2020). Lussi, A., & Jaeggi, T. (2008). refieren que estas bebidas, formuladas con cafeína, azúcares, y ácidos como el cítrico y fosfórico, presentan un pH bajo, lo cual puede favorecer procesos de desmineralización del esmalte dental. La exposición frecuente a este tipo de bebidas representa un factor de riesgo importante para la aparición de erosión dental, una condición multifactorial no bacteriana que afecta de manera irreversible los tejidos duros del diente, así lo mencionan Shellis, R. P., Featherstone, J. D. B., & Lussi, A. (2011).

La erosión dental inducida por ácidos dietéticos es cada vez más reportada en estudios odontológicos, siendo las bebidas energizantes consideradas entre las más agresivas debido a su bajo pH y alta capacidad de titulación ácida como lo mencionan Magalhães, A. C., Wiegand, A., Ríos, D., Buzalaf, M. A. R., & Lussi, A. (2011).

La situación se vuelve aún más preocupante en contextos donde no se dispone de suficiente información sobre los efectos erosivos de estos productos en la

salud oral de la población lo refieren Dugmore, C. R., & Rock, W. P. (2004).

En Paraguay, particularmente en la ciudad de Concepción, se ha observado un incremento del consumo de estas bebidas sin un control ni orientación adecuada, lo que podría tener consecuencias negativas a mediano y largo plazo para la salud bucodental de la población.

Dark Dog; Grupo C: Monster; Grupo D: Red Bull; Los datos fueron obtenidos y registrados por un solo examinador calibrado. Para la medición de pH se obtuvieron 16 muestras de 40ml para cada grupo. Ocho de ellas se midieron a 17°C y las otras ocho a 4°C en cada tipo de bebida, ya que son las temperaturas habituales de ingesta, para lo cual las muestras fueron mantenidas almacenadas a las temperaturas mencionadas. El pH fue medido usando un pHmetro digital calibrado microprocessor pH meter AOKTON, pH/Ion 510 (Cole-Parmer 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061 USA). Para cada grupo se obtuvieron los pH según temperatura y los datos fueron vaciados en una planilla Excel.

Objetivo: Determinar el ph y el potencial erosivo de las bebidas energizantes disponibles en el mercado de la ciudad de Concepción, Paraguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de la Investigación: Se realizó un estudio cuasiexperimental, cuantitativo y de corte transversal, orientado a determinar el pH de diferentes bebidas energizantes y evaluar su potencial efecto erosivo sobre el esmalte dental.

Población y Muestra: La población de estudio estuvo conformada por bebidas energizantes disponibles comercialmente en la ciudad de Concepción – Paraguay. Se seleccionaron aleatoriamente cuatro marcas: Baly, Dark Dog, Monster y Red Bull, conformando cuatro grupos experimentales (A, B, C y D). De cada grupo se analizaron 16 muestras de 40 ml, totalizando 64 muestras.

Criterios de Inclusión: Bebidas energéticas de venta libre en la ciudad de Concepción, en envases cerrados y adquiridas directamente en puntos de venta comerciales.

Criterios de exclusión: Bebidas energéticas con envases abiertos, dañados o con alteraciones en el contenido, así como aquellas que no correspondían a las marcas seleccionadas.

Método de Recolección de Datos: Las mediciones fueron realizadas por un solo examinador calibrado, utilizando un pHmetro digital calibrado Microprocessor pH meter AOKTON, pH/Ion 510 (Cole-Parmer 625 East Bunker Court Vernon Hills, IL 60061 USA). Para cada bebida se

midieron ocho muestras a 17 °C y ocho a 4 °C, considerando que estas corresponden a las temperaturas habituales de consumo. Las muestras fueron almacenadas previamente a dichas temperaturas. Los datos obtenidos fueron registrados y organizados en una planilla Excel.

Aspectos Estadísticos: Se emplearon estadísticas descriptivas para comparar los valores de pH obtenidos entre las distintas marcas y temperaturas, determinando los promedios, rangos y desviaciones estándar.

Aspectos Éticos: El estudio no involucró sujetos humanos ni animales, por lo que no requirió consentimiento informado. Se garantizó la rigurosidad científica en la manipulación de muestras y el registro de datos.

RESULTADOS

Todas las bebidas de la muestra presentaron $\text{pH} < 5.5$ considerado como crítico con un rango entre 2.8 - 3.4 a 4°C y 3,2-5,3 17°C. El menor fue para DARK DOG a 4°C ($\text{pH}=2.8$) y el mayor BALY a 17°C ($\text{pH}=5,3$). Los resultados de pH de las bebidas energéticas a diferentes temperaturas estudiadas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Promedio PH para cada grupo de bebidas energizantes.

Bebida	Promedio ph (17°C y 4°C)	Desviación estándar
BALY	4,2	1,1
DARK DOG	3	0,20
MONSTER	3,7	0,30
RED BULL	3,7	0,30

Tabla 2. Desviación estándar

Bebida	T° ambiente- 22°C	T° a 17°C	T° a 4°C
BALY	7,1	5,3	3,1
DARK DOG	7,8	3,2	2,8
MONSTER ENERGY	7,4	4,1	3,4
RED BULL	7,4	4,0	3,4

Una desviación estándar baja indica que el pH de la bebida es estable, sin grandes cambios al bajar la temperatura.

Una desviación estándar alta indica que el pH cambia mucho con la temperatura, como sucede con BALY, que bajó de 5,3 a 3,1.

El cambio brusco de pH puede influir en el efecto de la bebida sobre el esmalte dental.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que todas las bebidas energizantes analizadas presentaron valores de pH inferiores a 5.5, límite crítico considerado para la desmineralización del esmalte dental. Este hallazgo confirma que

dichas bebidas son potencialmente erosivas, coincidiendo con la literatura que señala que las bebidas ácidas representan un factor de riesgo importante para el desarrollo de erosión dental.

En relación con las marcas analizadas, se observó que Dark Dog presentó el valor más bajo de pH a 4 °C (2.8), lo cual indica un mayor potencial erosivo en comparación con las demás. Por otro lado, Baly alcanzó el valor más alto de pH a 17 °C (5.3), aunque este mismo grupo evidenció una notable variabilidad con el cambio de temperatura, reduciendo su pH hasta 3.1 a 4 °C. Esta variación se reflejó en la desviación estándar más elevada (1.1), lo que señala que el efecto erosivo de esta bebida puede intensificarse significativamente según la forma de consumo.

La comparación entre temperaturas sugiere que los valores de pH tienden a ser más bajos a 4 °C que a 17 °C, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. No obstante, desde el punto de vista clínico, este comportamiento resulta relevante, ya que el consumo de bebidas energizantes suele realizarse preferentemente a bajas temperaturas, aumentando el riesgo de erosión dental en condiciones reales de ingesta.

En cuanto a la estabilidad de los valores de pH, bebidas como Monster y Red Bull mostraron menor variabilidad con el cambio de temperatura, con desviaciones

estándar reducidas (0.30), lo que indica un comportamiento más constante en su acidez. Sin embargo, sus valores absolutos continúan ubicándose en un rango crítico, manteniéndose dentro de niveles que comprometen la integridad del esmalte dental.

Estos resultados concuerdan con estudios previos que señalan a las bebidas energéticas como productos con alta acidez y, por ende, con elevado potencial erosivo. Además, el hallazgo de que el pH disminuye en temperaturas bajas plantea la necesidad de considerar no solo la composición química de estas bebidas, sino también las condiciones en las que son consumidas.

Finalmente, la evidencia obtenida refuerza la importancia de promover campañas de concienciación sobre los riesgos asociados al consumo frecuente de bebidas energizantes, así como la necesidad de fomentar hábitos de prevención, como el enjuague posterior con agua o la moderación en la ingesta, con el fin de minimizar el impacto erosivo en la salud bucal.

Conclusiones

Todas las bebidas estudiadas presentaron pH ácido, haciendo de ellas bebidas potencialmente erosivas para los dientes. Los valores de pH fueron menores a 4°C que los medidos a 17°C, pero sin diferencias estadísticamente significativas

($p > 0.343$) Los valores de acidez no aparecen especificados en los envases y se sugiere considerarlos como información importante para la población que consume este tipo de bebidas.

Al ser la erosión un problema de salud pública es nuestro rol como profesionales odontólogos hacer notar estas falencias en los componentes y etiquetado, sugiriendo a la industria las modificaciones necesarias para educar a la población y desarrollar productos más saludables.

Referencias Bibliográficas

- 1- Poggi, M. A., Rizzo, M. H., & García, F. S. (2020). Consumo de bebidas energéticas y sus efectos sobre la salud oral. *Revista de Salud Pública*, 22(2), 186-193.
- 2- Lussi, A., & Jaeggi, T. (2008). Erosion—diagnosis and risk factors. *Clinical Oral Investigations*, 12(Suppl 1), S5-S13. doi:10.1007/s00784-007-0179-z
- 3- Shellis, R. P., Featherstone, J. D. B., & Lussi, A. (2011). Understanding the chemistry of dental erosion. *Monographs in Oral Science*, 20, 13-23. doi:10.1159/000325942
- 4- Magalhães, A. C., Wiegand, A., Rios, D., Buzalaf, M. A. R., & Lussi, A. (2011). Impact of erosive processes on dentine: A review.

Journal of Dentistry, 39(4), 241-258.

doi:10.1016/j.jdent.2011.01.005

- 5- Dugmore, C. R., & Rock, W. P.
(2004). The prevalence of tooth
erosion in 12-year-old children.
British Dental Journal, 196(5), 279-
282; discussion273

36. Energía

Desarrollo de Materiales Nanocompuestos para la Producción Eficiente de Amoníaco Verde.

Autor: Fuentes, Nagelin G., nagelin.fuentes@estudiantes.uv.cl

Co-autor: Saavedra, Daniel; Rojas, Susana D.; Cisternas, Marcelo A.

Orientador: Cisternas, Marcelo A.; marcelo.cisternas@uv.cl

Universidad de Valparaíso / Escuela de Ingeniería Industrial.

Resumen

Este proyecto busca desarrollar un sistema eficiente de producción y almacenamiento de hidrógeno (H_2) verde utilizando el amoníaco (NH_3) como vector energético. Esto debido a que el H_2 verde enfrenta múltiples desafíos principalmente asociados a su manejo y transporte.

El objetivo es evaluar el desempeño de materiales avanzados —puntos cuánticos de carbono (CQDs), dióxido de titanio (TiO_2) y nitruro de carbono grafitico ($g-C_3N_4$)— aplicados en los procesos fotocatalíticos de síntesis de NH_3 . Este proceso se llevará a cabo a través del proceso de water splitting y la división del nitrógeno molecular para generar NH_3 . La metodología considera la síntesis de estos materiales, su caracterización y pruebas preliminares de desempeño.

Resultados preliminares muestran de manera exitosa la síntesis de CQDs a partir de quitosano y la formación de nanoestructuras laminares de $g-C_3N_4$, que combinadas con nanoesferas de TiO_2 , mejoran la eficiencia del proceso de producción de NH_3 . Esta investigación busca contribuir al desarrollo de soluciones tecnológicas viables para la economía del hidrógeno.

Palabras clave: H_2 verde, NH_3 verde, CQDs, nanoestructuras.

Introducción

El cambio climático, impulsado por la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI) derivados de la quema de combustibles fósiles, está generando alteraciones sostenidas en los patrones climáticos, incrementos del nivel del mar y mayor frecuencia de eventos extremos (McKay et al., 2022; Calleja-Agius et al., 2021). Este panorama ha acelerado la transición hacia vectores energéticos y tecnologías de conversión con baja huella de carbono, entre los cuales destacan el hidrógeno verde (H_2) y el amoníaco verde (NH_3) como portadores de energía de interés estratégico (Squadrito et al., 2023; Olabi et al., 2023).

El hidrógeno verde se obtiene por electrólisis del agua utilizando electricidad renovable; su combustión produce agua como subproducto y no genera CO_2 . Sin embargo, enfrenta desafíos de costo (actualmente superior al hidrógeno fósil), baja participación en la oferta global y exigencias de infraestructura (electrolizadores, almacenamiento presurizado/criogénico y redes de distribución), lo que limita su despliegue masivo a corto plazo (Horri & Ozcan, 2024; Ma et al., 2024). En este contexto, el amoníaco verde, sintetizado a partir de

H_2 libre de carbono y nitrógeno, se ha propuesto como vector alternativo por su alta densidad volumétrica de hidrógeno (mayor que la del H_2 líquido), su almacenamiento a presiones moderadas y la infraestructura existente en la industria de fertilizantes, que facilita su transporte y manejo (Ojelade et al., 2023; Campion et al., 2023). Además, presenta aplicaciones energéticas y químicas promisorias (combustible marítimo, generación eléctrica, síntesis de insumos) que amplían su valor estratégico (Wang et al., 2023).

Para avanzar hacia una producción sostenible de combustibles y precursores nitrogenados, la división fotocatalítica del agua (photocatalytic water splitting) y la reducción fotocatalítica de especies nitrogenadas constituyen rutas de alto potencial. En estos procesos, un semiconductor absorbe radiación solar y genera pares electrón-hueco que impulsan reacciones de reducción y oxidación acopladas. La eficiencia depende de parámetros como el ancho de banda prohibida (bandgap), la separación de cargas, la alineación de bandas en heteroestructuras y la estabilidad frente a fotocorrosión. Estrategias como dopaje, fotosensibilización y formación de heterouniones entre semiconductores

permiten extender la absorción hacia el visible, disminuir recombinación y aumentar la actividad bajo irradiancia solar (Takata et al., 2020; Villa et al., 2021; Zhou et al., 2023).

En este marco, se seleccionaron cuatro nanomateriales fotocatalíticos (CQDs, $g\text{-C}_3\text{N}_4$, MoS_2 y TiO_2), por su madurez técnica, disponibilidad de rutas de síntesis y complementariedad funcional:

- **Puntos cuánticos de carbono (CQDs):** Nanopartículas de 2–10 nm con alto coeficiente de absorción (desde UV hasta visible), emisión ajustable y química superficial rica que permiten actuar como fotosensibilizadores y mediadores electrónicos. En contacto con TiO_2 o $g\text{-C}_3\text{N}_4$ favorecen la separación electrón-hueco, amplían el rango espectral útil y promueven rutas de transferencia de carga de baja barrera (Wang & Hu, 2014; Mozdbar et al., 2023). Estudios recientes han mostrado CQDs derivados de quitosano con buena dispersión acuosa y fluorescencia en visible, adecuados para integrarse a heteroestructuras

orientadas a procesos de reducción catalítica.

- **Nitruro de carbono grafítico ($g\text{-C}_3\text{N}_4$):** Semiconductor polimérico, libre de metales, con bandgap en el visible ($\approx 2,6\text{--}2,9$ eV), síntesis accesible (p. ej., calcinación de urea) y alta estabilidad térmica/química. Su estructura estratificada facilita la modificación superficial y la formación de heterouniones con TiO_2 o MoS_2 para mejorar la alineación de bandas y disminuir recombinación (Zhang et al., 2021).
- **Disulfuro de molibdeno (MoS_2):** Semiconductor laminar 2D con bandgap ajustable del infrarrojo cercano al visible ($\approx 1,2\text{--}1,9$ eV), lo que le otorga absorción eficiente en visible y funcionalidad como co-catalizador para acelerar transferencia de electrones, suprimir recombinación y habilitar rutas de reducción bajo iluminación solar. Sus sitios activos y la química de borde contribuyen a la actividad catalítica (Ansari & Mohebbi, 2016; Forsberg et al., 2016).

- **Dióxido de titanio (TiO_2):** Es el fotocatalizador de referencia por su estabilidad físico-química, abundancia y costo relativamente bajo. Su limitación intrínseca es un bandgap amplio ($\sim 3,2$ eV) que restringe la actividad a la región UV del espectro solar. Para abordar este límite, se emplean modificación como el dopaje, la sensibilización con CQDs y la formación de heterouniones con semiconductores activos en visible (Takata et al., 2020; Zhou et al., 2023) que desplazan la absorción y mejoran la separación de cargas.

La hipótesis de trabajo sostiene que heteroestructuras basadas en TiO_2 / MoS_2 , $\text{g-C}_3\text{N}_4$ / MoS_2 y sus variantes sensibilizadas con CQDs pueden extender la captación de luz hacia el visible, optimizar la alineación de bandas y suprimir recombinación, mejorando así la conversión solar-química en rutas de interés para la síntesis de amoníaco verde. En consecuencia, este estudio se concentra en la síntesis, caracterización y evaluación fotocatalítica de estas arquitecturas, para aislar y cuantificar el aporte intrínseco de la ingeniería de materiales.

Objetivo general

Desarrollar y evaluar el desempeño fotocatalítico de dióxido de titanio (TiO_2), disulfuro de molibdeno (MoS_2), nitruro de carbono grafítico ($\text{g-C}_3\text{N}_4$) y puntos cuánticos de carbono (CQDs), tanto de forma individual como en combinaciones heteroestructuradas, para determinar cuáles nanomateriales y configuraciones presentan mayor eficiencia en la reducción de nitrógeno (N_2) hacia amoníaco verde (NH_3), contribuyendo a sistemas energéticos sostenibles y de bajas emisiones de carbono.

Objetivos Específicos

1. Sintetizar y caracterizar individualmente los nanomateriales seleccionados (CQDs, TiO_2 , MoS_2 , y $\text{g-C}_3\text{N}_4$) analizando sus propiedades estructurales, ópticas y morfológicas mediante técnicas como UV-Vis, FTIR, XRD, AFM y SEM, con el propósito de correlacionar sus características físicas y químicas con la actividad fotocatalítica.

2. Obtener heteroestructuras combinadas (CQDs/g-C₃N₄/TiO₂, g-C₃N₄/TiO₂, MoS₂/TiO₂, CQDs/g-C₃N₄, entre otras) con propiedades mejoradas de absorción en el visible, separación de cargas electrón-hueco y actividad fotocatalítica.
3. Evaluar experimentalmente la reducción fotocatalítica de N₂ a NH₃ bajo irradiación UV-visible en condiciones controladas de laboratorio, comparando el desempeño de nanomateriales individuales y heteroestructurados orientados a la producción sostenible de amoníaco verde.

a partir de 0,5 g de quitosano en 25 mL de agua ultrapura, a la cual se añadieron 154 mL de HNO₃ concentrado.

La mezcla obtenida se mantuvo bajo agitación continua durante 48 horas a temperatura ambiente y posteriormente se transfirió a un reactor hidrotermal de 100 mL, donde se sometió a 180 °C durante 1 hora. Finalizado este tiempo, el sistema se dejó enfriar dentro del horno hasta alcanzar la temperatura ambiente. El producto se filtró empleando una membrana PVDF de 0,22 µm y se almacenó en frascos de centrifuga de 15 mL, quedando listo para su posterior caracterización y aplicación.

Nitruro de Carbono Grafitico (g-C₃N₄)

El precursor utilizado fue urea (Urea, ACS Reag. Ph. Eur., ≥99.5% pureza, Merck, Cat. 108487), adquirida en forma de esferas blancas cristalinas. Se pesaron 100 g de urea previamente molida en mortero y se colocaron en un crisol cerámico con tapa suelta.

Posteriormente, la muestra fue introducida en una mufla con atmósfera de aire estático y sometida a un programa de calentamiento controlado de 5 °C/min hasta alcanzar los 550 °C, manteniéndose a dicha temperatura durante 2 horas. Una

Material y Método

Puntos Cuánticos de Carbono (CQDs)

El precursor empleado fue quitosano (Quitosano de caparzones de camarón, bajo peso molecular, ≥75% deacetilación; Sigma-Aldrich/Merck, Cat. 50494), de grado analítico. Como agente oxidante se utilizó ácido nítrico (Nitric acid, EMSURE®, 65% p/p, Merck, Cat. 100456). El agua utilizada en todas las etapas de la síntesis fue de calidad Milli-Q (18.2 MΩ·cm). Se preparó una disolución

vez finalizado el tratamiento térmico, el material se dejó enfriar dentro de la mufla hasta llegar a temperatura ambiente. El sólido obtenido correspondió a un polvo amarillo pálido, característico de $g\text{-C}_3\text{N}_4$, con nanoestructuras laminares y propiedades fotocatalíticas en el rango de luz visible.

Disulfuro de Molibdeno (MoS_2)

Se empleó disulfuro de molibdeno en forma de nanopulvo (Molybdenum(IV) sulfide, nanopowder, ~ 90 nm, 99% pureza, Sigma-Aldrich, Cat. 804169), con estructura cristalina hexagonal correspondiente a la fase 2H. La síntesis de MoS_2 exfoliado se llevó a cabo mediante exfoliación en fase líquida (LPE). Para ello, se pesaron entre 0,05 y 0,1 g de MoS_2 en nanopulvo y se dispersaron en un medio líquido. Se empleó como disolvente una mezcla de agua:isopropanol (1:1) con dodecil sulfato de sodio (SDS, 0,1% p/p) como surfactante estabilizante, o bien acetona anhidra (250 mL) en condiciones de sistema hermético. La suspensión resultante fue sometida a ultrasonido de sonda durante 75–90 minutos, manteniendo la temperatura por debajo de 30°C mediante baño de hielo, y posteriormente se centrifugó a 3000 g

durante 30 minutos. El sobrenadante recuperado correspondió a una nanodispersión estable de láminas de MoS_2 de pocas capas.

Dióxido de Titanio (TiO_2)

Se utilizó dióxido de titanio en fase anatasa, en forma de nanopulvo (99,8% pureza, Sigma-Aldrich, Cat. 232033). El nanopulvo de anatasa fue sometido previamente a un tratamiento térmico de calcinación a 400°C durante 2 horas, con el fin de eliminar contaminantes superficiales. Este material se destinó a la preparación de mezclas experimentales con CQDs, MoS_2 y $g\text{-C}_3\text{N}_4$ para la evaluación de heteroestructuras.

La caracterización de los nanomateriales se llevó a cabo empleando diversas técnicas espectroscópicas, estructurales y morfológicas, con el fin de validar su síntesis y asegurar su calidad para posteriores ensayos fotocatalíticos. La espectroscopía UV-Vis se utilizó de manera transversal para todos los materiales, ya que permitió registrar sus transiciones electrónicas y estimar la energía de banda prohibida (*bandgap*). En los puntos cuánticos de carbono (CQDs) se aplicó en modo de absorbancia para

analizar sus propiedades ópticas, mientras que en el g-C₃N₄ se empleó en modo de reflectancia difusa. En el caso del MoS₂, el análisis UV-Vis permitió evidenciar el ajuste de *bandgap* tras la exfoliación, y en TiO₂ se utilizó para calcular directamente su valor característico.

Las propiedades ópticas de emisión se evaluaron mediante espectroscopía de fluorescencia, aplicada a los CQDs, lo que permitió analizar su comportamiento bajo distintas longitudes de onda de excitación, aspecto fundamental para su rol como fotosensibilizadores en heteroestructuras. Asimismo, la espectroscopía FTIR se aplicó de manera diferenciada: en g-C₃N₄ se utilizó para identificar los enlaces C–N y C=N formados en la polimerización, en MoS₂ para verificar sus modos vibracionales característicos tras la exfoliación y en TiO₂ para confirmar la presencia de enlaces propios de su fase anatasa. En el caso particular de los CQDs, la caracterización química superficial se complementó con XPS, lo que permitió corroborar la presencia de grupos oxigenados y nitrogenados responsables de su reactividad.

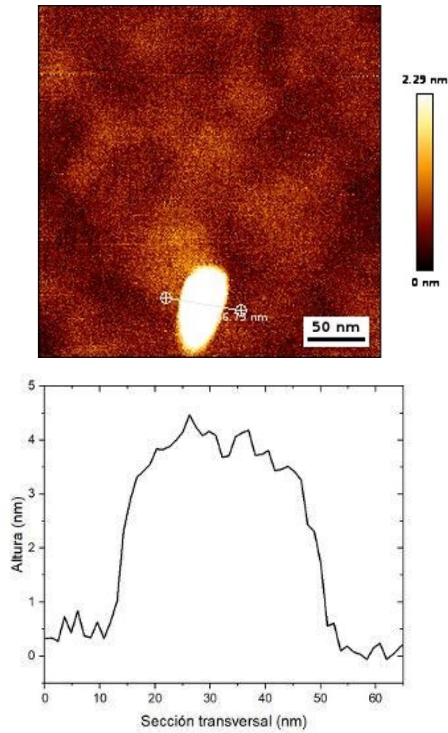
El análisis morfológico se realizó mediante microscopía electrónica y de

fuerza atómica. La microscopía TEM se aplicó a los CQDs para determinar su tamaño y morfología esférica, y en los materiales laminares como g-C₃N₄ y MoS₂ para confirmar la formación de nanosheets. Por su parte, la microscopía SEM se utilizó principalmente en g-C₃N₄ y MoS₂, permitiendo observar la estructura superficial y la homogeneidad de las láminas. Finalmente, la microscopía de fuerza atómica (AFM) se empleó en los CQDs para obtener mapas topográficos de la superficie en modo *tapping* y en MoS₂ para visualizar la distribución de capas y espesores tras la exfoliación.

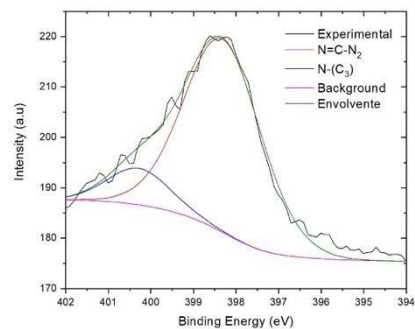
Resultados y Discusión

Figura 1

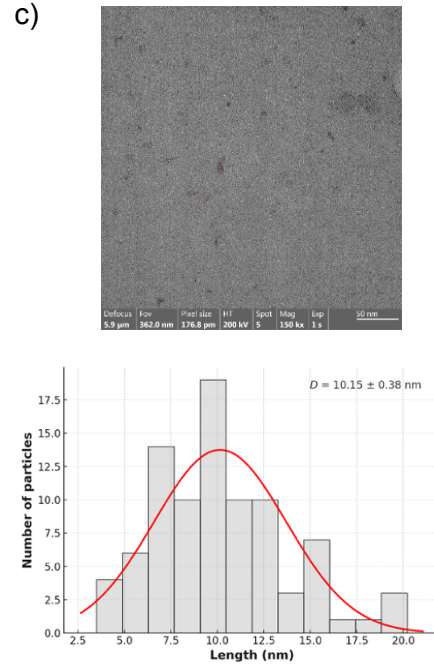
a)



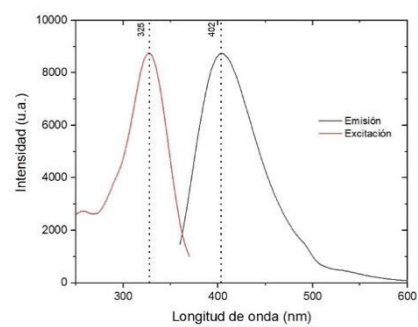
b)



c)



d)

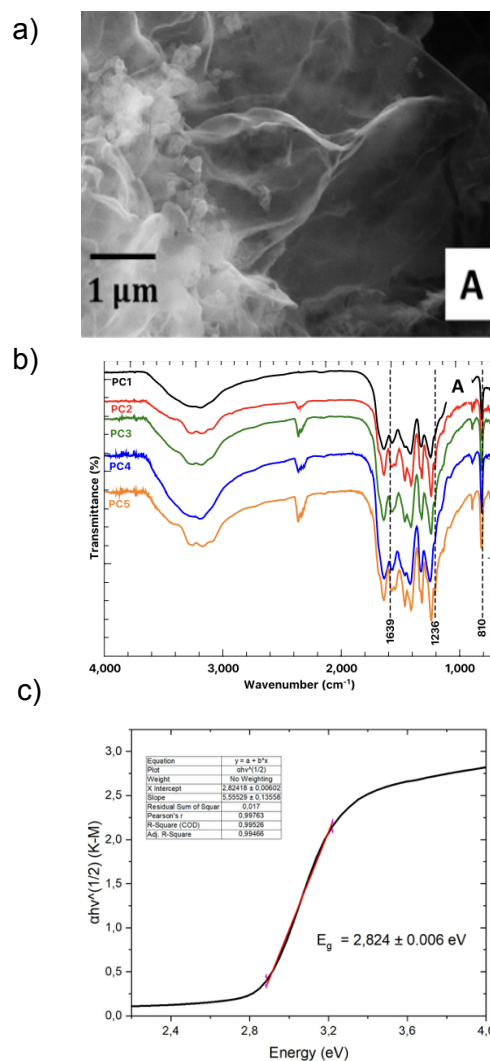


Caracterización de (CQDs): a) topografía AFM que revela un CQD individual con una altura medida de ~6 nm mediante perfil transversal AFM a una

escala de 50 [nm]; b) espectro XPS N 1s que muestra configuraciones de enlace relacionadas con nitrógeno ($N=C-N_2$, $N-(C_3)$) responsables de sus propiedades de fluorescencia; c) imagen TEM de CQDs dispersos; distribución de tamaños de partícula obtenida del análisis TEM; d) espectros de fluorescencia que muestran un pico de excitación en ~ 320 nm y un pico de emisión en ~ 400 nm. (Fuente: Elaboración propia)

Los puntos cuánticos de carbono (CQDs) sintetizados a partir de quitosano y ácido nítrico evidenciaron un tamaño promedio de 3–6 nm y morfología cuasi-esférica, con buena dispersión acuosa y baja rugosidad superficial, lo que sugiere una deposición uniforme y estable. Las imágenes AFM y TEM confirmaron su escala nanométrica y homogeneidad, mientras que la distribución de tamaños reforzó la consistencia de las partículas obtenidas. En el análisis óptico, los espectros UV-Vis mostraron absorción característica en 280–320 nm y la fotoluminiscencia presentó emisiones entre 420–460 nm, atribuibles al efecto de confinamiento cuántico, en concordancia con lo descrito por Mozdbar et al. (2023) y Wang y Hu (2014).

Figura 2



Caracterización de (g-C₃N₄): a) Micrografías FE-SEM y TEM de compuestos g-C₃N₄ obtenidos de la pirólisis de urea; b) espectro FTIR (Fuente: Rojas et al., 2021); c)

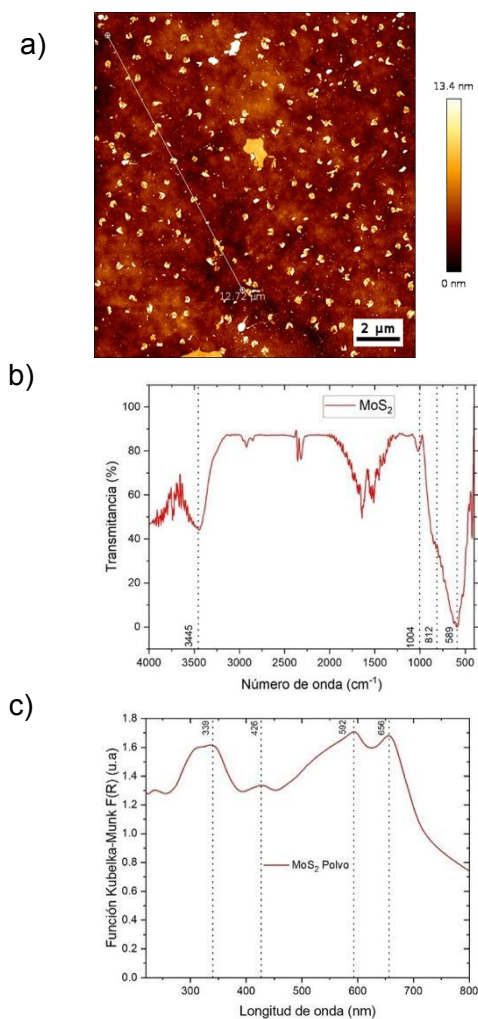
Determinación del ancho de banda prohibida (*bandgap*) de g-C₃N₄ mediante el método de Tauc-plot (Fuente: Elaboración propia).

A nivel químico, la espectroscopía XPS reveló la presencia de grupos oxigenados y nitrogenados superficiales (C=O, C-O, N-H), así como configuraciones de enlace asociadas al nitrógeno (N=C-N₂, N-(C₃)), que podrían estar relacionadas con sus propiedades de fluorescencia. En conjunto, estos resultados abren la posibilidad de que los CQDs actúen como fotosensibilizadores efectivos, con capacidad de mejorar la transferencia electrónica y reducir la recombinación electrón-hueco cuando se integran en heteroestructuras que potencialmente incrementaría la eficiencia fotocatalítica.

El g-C₃N₄ obtenido por calcinación de urea (100 g, 550 °C, 2–3 h) se presentó como un polvo amarillo pálido con estructura laminar. Las imágenes FE-SEM mostraron nanoestructuras laminares con porosidad uniforme, mientras que el análisis TEM sugirió que, a tiempos cortos de calcinación, las láminas permanecían planas, pero al prolongar el tratamiento térmico existió la posibilidad de que estas comenzaran a curvarse y formar estructuras tubulares,

observándose incluso *scrolls* característicos. Los espectros FTIR evidenciaron vibraciones atribuibles a la red polimérica triazínica, con señales en 810 cm⁻¹ (anillo triazina), 1236–1247 cm⁻¹ (C=N), 1639 cm⁻¹ (C-N), además de una banda ancha en 2800–3500 cm⁻¹ asociada a -OH/-NH₂ superficiales, lo que podría estar relacionado con la presencia de defectos y grupos activos en la superficie. En el plano óptico, el UV-Vis por reflectancia difusa transformado mediante Kubelka-Munk y ajustado con Tauc-plot arrojó un *band gap* indirecto de 2,8 eV ($\approx 2,824 \pm 0,006$ eV, $R^2 = 0,9946$), valor que coincide con lo reportado para este material (Rojas et al., 2021). Estos resultados indican la posibilidad de que el g-C₃N₄ absorba eficientemente en la región visible, reforzando su interés en aplicaciones fotocatalíticas. Sin embargo, considerando la tendencia del material a la rápida recombinación de cargas, se abre la posibilidad de mejorar su desempeño mediante estrategias como la formación de heteroestructuras con TiO₂ o la sensibilización con CQDs, tal como sugieren estudios previos (Zhang et al., 2021).

Figura 3



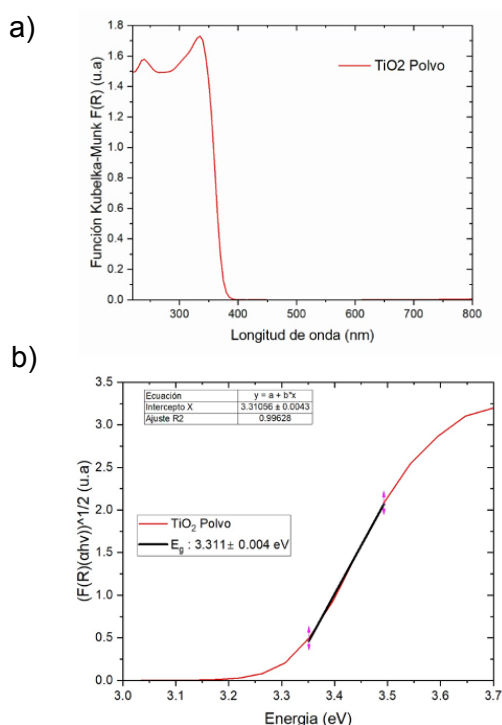
Caracterización de (MoS_2): a) topografía AFM que revela nanosheets distribuidos de manera homogénea, con espesores en escala nanométrica (altura máxima medida $\sim 13,4$ nm en la barra de

color y distancia analizada de $12,72 \mu\text{m}$); b) espectro FTIR que muestra pico a 3445 cm^{-1} asociado a O–H (agua superficial o grupos hidroxilo por exfoliación). Señales en 1004 , 812 y 589 cm^{-1} correspondientes a modos vibracionales característicos del material; c) Espectro UV-Vis del MoS_2 , muestra pico de absorción en 339 nm (UV, $\sim 1,6 \text{ F(R)}$), 426 nm (UV, $\sim 1,3 \text{ F(R)}$, comportamiento de granel), 592 nm (VIS, $\sim 1,7 \text{ F(R)}$, máxima absorción) y 656 nm (VIS, $\sim 1,7 \text{ F(R)}$). (Fuente: Elaboración propia)

El MoS_2 exfoliado mostró láminas ultradelgadas con morfología homogénea y rugosidad superficial reducida, lo que sugiere una deposición estable y controlada. El análisis por AFM evidenció la distribución uniforme de nanosheets en la superficie, mientras que la espectroscopía FTIR reveló modos vibracionales característicos, junto con una señal en 3445 cm^{-1} atribuida a grupos hidroxilo o moléculas de agua adsorbidas, lo cual podría incrementar la interacción del material con medios acuosos. En el análisis óptico, los espectros UV-Vis exhibieron transiciones electrónicas con picos en 339 , 426 , 592 y 656 nm , destacando una absorción intensa en la región visible que podría asociarse a un bandgap ajustable en el rango $1,2\text{--}1,9 \text{ eV}$,

en concordancia con lo descrito por Ansari y Mohebbi (2016). Estos resultados abren la posibilidad de que el MoS_2 , gracias a su estructura laminar y capacidad de absorción en visible, funcione como co-catalizador en combinación con óxidos como TiO_2 , favoreciendo la separación de cargas electrón-hueco y contribuyendo potencialmente a mejorar la eficiencia en procesos fotocatalíticos orientados a la síntesis de amoníaco verde.

Figura 4



Caracterización de (TiO_2): a) Espectro de absorción UV-Vis de TiO_2 en fase anatasa. Se observa un borde de absorción pronunciado alrededor de 380

nm, lo que confirma que el material absorbe principalmente en la región ultravioleta; b) Gráfica de análisis de energía de banda prohibida. El ajuste lineal mediante el método de Tauc arrojó un valor de $E_g = 3,311 \pm 0,004 \text{ eV}$, consistente con la fase anatasa del TiO_2 (Fuente: Tesis Katherine Alarcón, 2024).

El TiO_2 en polvo (fase anatasa, 99,8%) mostró un borde de absorción pronunciado en la región ultravioleta, cercano a los 380 nm, según el espectro UV-Vis (Figura a), lo que confirma su actividad óptica restringida principalmente al rango UV. A partir del análisis de Tauc-plot (Figura b) se estimó una energía de banda prohibida indirecta de $3,311 \pm 0,004 \text{ eV}$, valor coherente con lo reportado para TiO_2 anatasa en la literatura (Takata et al., 2020; Villa et al., 2021). Sin embargo, la limitación de su absorción a la región ultravioleta plantea la posibilidad de mejorar su desempeño mediante su integración con otros materiales activos en el visible, como los CQDs, el $\text{g-C}_3\text{N}_4$ o el MoS_2 . Estudios previos han señalado que la formación de heteroestructuras de TiO_2 con semiconductores de menor bandgap permite extender la absorción hacia el espectro visible y reducir la recombinación electrón-hueco, incrementando así la eficiencia en procesos fotocatalíticos

(Zhou et al., 2023; Ansari & Mohebbi, 2016). En este contexto, el TiO_2 podría actuar como base estable y robusta dentro de sistemas híbridos, mientras que los materiales sensibilizadores aportarían la capacidad de aprovechar la radiación solar de manera más eficiente, lo que abre un escenario prometedor para su aplicación en la producción de amoníaco verde.

Conclusiones

Los resultados preliminares sugieren la posibilidad de que el enfoque propuesto para la producción de amoníaco verde mediante fotocátalisis basada en nanomateriales pueda convertirse en una vía viable a futuro. La síntesis de puntos cuánticos de carbono (CQDs) a partir de quitosano, junto con la obtención de $\text{g-C}_3\text{N}_4$ laminar, MoS_2 exfoliado y TiO_2 anatasa, permitió disponer de un conjunto de materiales con propiedades ópticas, estructurales y químicas complementarias. La caracterización (UV-Vis, fluorescencia, FTIR, XPS, TEM, AFM/SEM) entregó evidencias consistentes: los CQDs mostraron tamaños de 3–6 nm y química superficial activa; el $\text{g-C}_3\text{N}_4$ presentó un bandgap en el visible ($\sim 2,8$ eV); el MoS_2 exhibió absorción intensa en la región

visible; y el TiO_2 demostró estabilidad, aunque con actividad restringida al UV. Estos hechos permiten plantear, aunque aún de manera incierta, que heteroestructuras bien diseñadas podrían ampliar la captación espectral, favorecer la separación de cargas y reducir la recombinación electrón-hueco.

Desde una perspectiva mecanística, es posible que los sistemas fotocatalíticos diseñados entre $\text{g-C}_3\text{N}_4/\text{MoS}_2/\text{TiO}_2$, sensibilizadas con CQDs, generen sinergias relevantes. Los CQDs podrían actuar como mediadores electrónicos y antenas ópticas, MoS_2 como co-catalizador de transferencia de electrones, el $\text{g-C}_3\text{N}_4$ como absorbente en visible, y el TiO_2 como base estructural y estable. Aunque estas proyecciones aún requieren comprobación bajo irradiancia solar real y en condiciones de mayor escala, los resultados iniciales respaldan la hipótesis de que tales combinaciones podrían contribuir a la viabilidad de la síntesis fotocatalítica de NH_3 .

En términos de impacto tecnológico, el amoníaco verde ofrece la posibilidad de superar algunas limitaciones del hidrógeno molecular: mayor densidad volumétrica, transporte y almacenamiento más simples, y el

aprovechamiento de infraestructura ya instalada en la industria de fertilizantes. Si las heteroestructuras logran demostrar estabilidad y selectividad en procesos de largo plazo, podrían reducir las barreras actuales de costo y despliegue del H₂ verde, acercando este sistema a aplicaciones energéticas y químicas con baja huella de carbono.

En síntesis, este trabajo establece bases sólidas para considerar a los nanocompuestos CQDs, g-C₃N₄, MoS₂ y TiO₂ como una plataforma con potencial para el desarrollo de tecnologías de amoníaco verde. La posibilidad de transformar estos resultados preliminares en avances tecnológicos dependerá de la continuidad experimental y de la validación en escenarios más cercanos a la aplicación real, abriendo un camino prometedor, aunque aún incierto, hacia una economía del hidrógeno sostenible.

Referencias Bibliográficas

- McKay, D. I. A., et al. (2022). Exceeding 1.5 °C global warming could trigger multiple climate tipping points. *Science*, 377(6611), eabn7950.
- Calleja-Agius, J., England, K., & Calleja, N. (2021). The effect of global warming on mortality. *Early Human Development*, 155, 105324.
- Squadrito, G., Maggio, G., Nicita, A., Antonucci, V., & Freni, A. (2023). A perspective on green hydrogen: Techno-economic challenges and future directions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(5), 1562–1578.
- Olabi, A. G., Abdelkareem, M. A., & Sayed, E. T. (2023). Green ammonia as an energy vector and hydrogen carrier: Fundamentals, synthesis and applications. *Energy Conversion and Management*, 278, 116720.
- Horri, B. A., & Ozcan, H. (2024). Economics and scaling challenges of green hydrogen production: A techno-economic review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 185, 113517.
- Ma, N., et al. (2024). Emerging strategies for efficient photocatalytic nitrogen fixation into ammonia. *International Journal of Hydrogen Energy*, 50, 379–396.
- Ojelade, O. A., et al. (2023). Prospects of green ammonia as a carbon-free fuel for power and transport. *Sustainable Energy*

-
- Technologies and Assessments*, 56, 103159.
- Campion, C. L., et al. (2023). Ammonia as an energy vector: A review of systems, applications, and future outlook. *Journal of Cleaner Production*, 401, 136754.
 - Wang, Y., et al. (2023). Progress in photocatalytic ammonia synthesis: From fundamentals to strategies. *Applied Catalysis B: Environmental*, 329, 122570.
 - Takata, T., et al. (2020). Photocatalytic water splitting with a quantum efficiency of almost unity. *Nature*, 581(7809), 411–414.
 - Villa, K., et al. (2021). Metal-free photocatalysts for water splitting and CO₂ reduction. *Chemical Society Reviews*, 50(5), 2705–2730.
 - Zhou, L., et al. (2023). Advances in heterostructured photocatalysts for solar-driven nitrogen reduction. *Nature Communications*, 14, 3132.
 - Wang, F., & Hu, Y. (2014). Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 2, 6921–6939.
 - Mozdbar, S. R., et al. (2023). Carbon quantum dots derived from biomass: Photoluminescence and photocatalytic applications. *Materials Today Chemistry*, 29, 101388.
 - Zhang, J., et al. (2021). Recent advances in g-C₃N₄-based photocatalysts for nitrogen reduction reaction. *Applied Catalysis B: Environmental*, 293, 120241.
 - Ansari, M., & Mohebbi, S. (2016). MoS₂ nanostructures: A review of synthesis, properties, and applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 27, 3109–3130.
 - Forsberg, K., et al. (2016). MoS₂ as a co-catalyst for photocatalytic hydrogen evolution: Insights from experiments and DFT. *Catalysis Today*, 278(1), 3–15.
 - Rojas, S. D., et al. (2021). Photocatalytic nitrogen fixation with carbon nitride-based materials. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 421, 113513.
 - Rojas, S. D., et al. (2021). Photocatalytic reduction of nitrogen oxides to ammonia using hybrid catalysts. *Journal of*
-

Photochemistry and Photobiology
A: Chemistry, 406, 113001.

- Alarcón, K. (2024). *Síntesis y caracterización de películas delgadas de TiO₂ obtenidas por sputtering para aplicaciones fotocatalíticas* [Tesis de licenciatura, Universidad de Valparaíso]. Universidad de Valparaíso, Repositorio Institucional.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) a través del *National Call for the Grant for Installation in Academia (SIA), convocatoria 2021, proyecto N.º SA77210032*. Asimismo, se recibió apoyo del Ministerio de Educación de Chile mediante el proyecto “*Strengthening Graduate Studies and Research, Innovation, and Knowledge Transfer at the University of Valparaíso for Greater Inclusion, Diversity, and Internationalization*”, código UVA22991. Finalmente, parte de este estudio fue respaldado por el proyecto PUENTE-2024-25, titulado “*Carbon-dot*

Enhanced Nanostructured Surfaces for Ultra-green Hydrogen Production”.

Agradecimientos

Este trabajo agradece al Laboratorio de Superficies del Instituto de Física de la Pontificia Universidad Católica de Chile por el apoyo experimental y la infraestructura puesta a disposición para el desarrollo de esta investigación. Asimismo, se reconoce la valiosa información aportada por la tesis de Katherine Alarcón (2024) sobre TiO₂, que contribuyó al análisis y discusión de los resultados. De igual manera, se agradece a Rojas et al. (2021) por la información experimental y bibliográfica que enriqueció la comprensión de los procesos fotocatalíticos considerados en este trabajo.



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO



UNIVERSIDAD
NACIONAL ✦
DE TUCUMÁN



